

**IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EPSTEIN - BARR VIRUS - SPEZIFISCHER
MEMBRANPROTEINE DURCH
SYNTHETISCHE OLIGOPEPTIDE**

KARL KLEINHANS

1987

Disbui.

München

1988



Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. F. Deinhardt
Abteilung Molekulare und Tumorstudiologie
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. H. Wolf

eingereicht über das

Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Dr. h.c. mult. A. Mayr

IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EPSTEIN-BARR VIRUS-SPEZIFISCHER

MEMBRANPROTEINE DURCH SYNTHETISCHE OLIGOPEPTIDE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Karl Kleinhans
aus
Bad Mergentheim-Markelsheim

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. G. Terplan

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

1.1	Einleitung	1
1.2	Die Bedeutung der Arbeit	2
1.3	Die Aufgaben der Arbeit	3
1.4	Die Bedeutung der Arbeit	4
1.5	Die Aufgaben der Arbeit	5
1.6	Die Bedeutung der Arbeit	6
1.7	Die Aufgaben der Arbeit	7
1.8	Die Bedeutung der Arbeit	8
1.9	Die Aufgaben der Arbeit	9
1.10	Die Bedeutung der Arbeit	10
1.11	Die Aufgaben der Arbeit	11
1.12	Die Bedeutung der Arbeit	12
1.13	Die Aufgaben der Arbeit	13
1.14	Die Bedeutung der Arbeit	14
1.15	Die Aufgaben der Arbeit	15
1.16	Die Bedeutung der Arbeit	16
1.17	Die Aufgaben der Arbeit	17
1.18	Die Bedeutung der Arbeit	18
1.19	Die Aufgaben der Arbeit	19
1.20	Die Bedeutung der Arbeit	20
1.21	Die Aufgaben der Arbeit	21
1.22	Die Bedeutung der Arbeit	22
1.23	Die Aufgaben der Arbeit	23
1.24	Die Bedeutung der Arbeit	24
1.25	Die Aufgaben der Arbeit	25
1.26	Die Bedeutung der Arbeit	26
1.27	Die Aufgaben der Arbeit	27
1.28	Die Bedeutung der Arbeit	28
1.29	Die Aufgaben der Arbeit	29
1.30	Die Bedeutung der Arbeit	30
1.31	Die Aufgaben der Arbeit	31
1.32	Die Bedeutung der Arbeit	32
1.33	Die Aufgaben der Arbeit	33
1.34	Die Bedeutung der Arbeit	34
1.35	Die Aufgaben der Arbeit	35
1.36	Die Bedeutung der Arbeit	36
1.37	Die Aufgaben der Arbeit	37
1.38	Die Bedeutung der Arbeit	38
1.39	Die Aufgaben der Arbeit	39
1.40	Die Bedeutung der Arbeit	40
1.41	Die Aufgaben der Arbeit	41
1.42	Die Bedeutung der Arbeit	42
1.43	Die Aufgaben der Arbeit	43
1.44	Die Bedeutung der Arbeit	44
1.45	Die Aufgaben der Arbeit	45
1.46	Die Bedeutung der Arbeit	46
1.47	Die Aufgaben der Arbeit	47
1.48	Die Bedeutung der Arbeit	48
1.49	Die Aufgaben der Arbeit	49
1.50	Die Bedeutung der Arbeit	50
1.51	Die Aufgaben der Arbeit	51
1.52	Die Bedeutung der Arbeit	52
1.53	Die Aufgaben der Arbeit	53
1.54	Die Bedeutung der Arbeit	54
1.55	Die Aufgaben der Arbeit	55
1.56	Die Bedeutung der Arbeit	56
1.57	Die Aufgaben der Arbeit	57
1.58	Die Bedeutung der Arbeit	58
1.59	Die Aufgaben der Arbeit	59
1.60	Die Bedeutung der Arbeit	60
1.61	Die Aufgaben der Arbeit	61
1.62	Die Bedeutung der Arbeit	62
1.63	Die Aufgaben der Arbeit	63
1.64	Die Bedeutung der Arbeit	64
1.65	Die Aufgaben der Arbeit	65
1.66	Die Bedeutung der Arbeit	66
1.67	Die Aufgaben der Arbeit	67
1.68	Die Bedeutung der Arbeit	68
1.69	Die Aufgaben der Arbeit	69
1.70	Die Bedeutung der Arbeit	70
1.71	Die Aufgaben der Arbeit	71
1.72	Die Bedeutung der Arbeit	72
1.73	Die Aufgaben der Arbeit	73
1.74	Die Bedeutung der Arbeit	74
1.75	Die Aufgaben der Arbeit	75
1.76	Die Bedeutung der Arbeit	76
1.77	Die Aufgaben der Arbeit	77
1.78	Die Bedeutung der Arbeit	78
1.79	Die Aufgaben der Arbeit	79
1.80	Die Bedeutung der Arbeit	80
1.81	Die Aufgaben der Arbeit	81
1.82	Die Bedeutung der Arbeit	82
1.83	Die Aufgaben der Arbeit	83
1.84	Die Bedeutung der Arbeit	84
1.85	Die Aufgaben der Arbeit	85
1.86	Die Bedeutung der Arbeit	86
1.87	Die Aufgaben der Arbeit	87
1.88	Die Bedeutung der Arbeit	88
1.89	Die Aufgaben der Arbeit	89
1.90	Die Bedeutung der Arbeit	90
1.91	Die Aufgaben der Arbeit	91
1.92	Die Bedeutung der Arbeit	92
1.93	Die Aufgaben der Arbeit	93
1.94	Die Bedeutung der Arbeit	94
1.95	Die Aufgaben der Arbeit	95
1.96	Die Bedeutung der Arbeit	96
1.97	Die Aufgaben der Arbeit	97
1.98	Die Bedeutung der Arbeit	98
1.99	Die Aufgaben der Arbeit	99
1.100	Die Bedeutung der Arbeit	100

Meinen Eltern

gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1 E I N L E I T U N G	1
2 S C H R I F T T U M	3
2.1 Karzinogene Faktoren	3
2.2 Das Epstein-Barr Virus	4
2.2.1 Klassifizierung und Charakterisierung des Epstein-Barr Virus	4
2.2.2 Geschichtliches zum Epstein-Barr Virus	5
2.2.3 Morphologie des Epstein-Barr Virus	8
2.2.4 Biologische Eigenschaften des Epstein-Barr Virus	9
2.2.5 Induktion des EBV-Genoms durch pflanzliche Inhaltsstoffe	13
2.2.6 Modus, Epidemiologie und Inzidenz einer EBV-Infektion	16
2.2.7 EBV-determinierte Antigen-Antikörper und ihre diagnostische Bedeutung	22
2.2.7.1 Virus-Kapsid-Antigene	23
2.2.7.2 Membran-Antigene	25
2.2.7.3 Früher Antigen-Komplex	28
2.2.7.4 EBV-assoziiertes nukleäres Antigen	30
2.2.7.5 Lymphozyten-determiniertes Membran-Antigen	32
2.2.7.6 Heterophile Antigene	32
2.2.7.7 EBV-neutralisierende Antikörper	34
2.2.7.8 Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität	34
2.2.7.9 Antigen-Expression bei EBV-tragenden Zelllinien	36
2.2.7.10 Expression von EBV-Antigenen während des viralen Zyklus	36
2.2.7.11 EBV-spezifische Antigen-Antikörper-Muster	37
2.2.8 Wege zur Identifizierung und Herstellung antigenen Regionen	37
2.2.9 Charakterisierung EBV-assoziiierter Erkrankungen	39
2.2.9.1 Infektiöse Mononukleose	40
2.2.9.2 Burkitt-Lymphom	46
2.2.9.3 Nasopharynx-Karzinom	50
2.2.9.4 Lymphome bei Immundefizienz	56

3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	60
3.1	MATERIAL UND METHODEN	60
3.1.1	Auswahlkriterien von 6 Antigenen des EBV-Genoms für die Peptidsynthese	60
3.1.2	Festphasen-Synthese	61
3.1.2.1	Verwendete Aminosäuren	66
3.1.2.2	Handsynthese-Verfahren	67
3.1.2.3	Vollautomatisierte Peptidsynthese	71
3.1.3	HF-Abspaltung der synthetisierten Peptide	74
3.1.4	Peptidreinigung	77
3.1.4.1	Gelfiltration	77
3.1.4.2	Erstellung einer Elutionskurve und "Eichgeraden"	78
3.1.4.3	Reinigung der synthetisierten Peptide	80
3.1.5	Immunisierung von Kaninchen mit synthetisierten Peptiden	83
3.1.6	ELISA-Tests mit den synthetisierten Peptiden	86
3.1.6.1	Methodisches Vorgehen beim Durchführen eines ELISAs	87
3.1.6.2	Auswahlkriterien verschiedener Gruppen von Humanseren	88
3.1.6.3	Anzahl eingesetzter Seren und Titrationsplatten in verschiedenen Untersuchungsreihen des ELISAs	89
3.1.7	SDS-Gelelektrophorese	90
3.1.7.1	Western Blotting mit anti-Peptidseren	91
3.1.7.2	Immunpräzipitation mit anti-Peptidseren	96
3.1.8	Immunfluoreszenztest mit anti-Peptidseren	96
3.2	ERGEBNISSE	98
3.2.1	Resultate der Peptidsynthesen	98
3.2.2	Gewichtsverluste der synthetisierten Peptide bei der HF-Abspaltung und Reinigung mittels Gelfiltration	98
3.2.3	Erzielte Antikörpertiter nach 4facher Boosterung von Kaninchen mit synthetischen EBV-Peptiden	99
3.2.4	Bestimmung von IgA-, IgG- und IgM-Titern in Humanseren gegen EBV-Peptide mittels ELISA-Test	102
3.2.4.1	Testreihen mit 4 Gruppen von Humanseren und Darlegung ihrer OD-Werte	102
3.2.4.2	Geometrische Verdünnungsreihen einiger Humanseren mit IgA, IgG und IgM gegen die hergestellten EBV-Peptide	113

3.2.5	In vivo gewonnene AK-Titer und Reaktionsintensität der betreffenden Antigene beim Austesten von Humanseren im ELISA - eine Gegenüberstellung der Ergebnisse	117
3.2.6	Ergebnisse der Immunpräzipitation mit Anti-peptidseren aus Kaninchen	118
3.2.7	Immunfluoreszenz-Reaktion von Anti-peptidseren	120
4	D I S K U S S I O N	124
4.1	Computervorhersage antigener Bereiche und ihre experimentelle Bestätigung	124
4.2	Einflußfaktoren auf die Titerhöhe der in vivo gewonnenen Antiseren	125
4.3	Charakterisierung Epstein-Barr Virus-spezifischer Membranproteine durch synthetische Oligopeptide	127
4.4	Verwendung synthetischer Oligopeptide im ELISA zur serologischen Diagnostik EBV-korrelierter Erkrankungen	129
4.4.1	Reaktionsintensität EBV-positiver und -negativer Humanseren bei drei verschiedenen Immunglobulinen	129
4.4.2	Diagnostische Verwendbarkeit der getesteten Oligopeptide	130
4.5	Verwendbarkeit der synthetisierten Oligopeptide als Vakzine gegen EBV-korrelierte Erkrankungen	134
5	Z U S A M M E N F A S S U N G	138
6	S U M M A R Y	140
7	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	142
8	A N H A N G	158
8.1	Verzeichnis der Abkürzungen	158
8.2	Verzeichnis chemischer Formeln	160
	D A N K S A G U N G	161
	L E B E N S L A U F	162

1 EINLEITUNG

=====

Die eminente Bedeutung onkogener Viren hat seit geraumer Zeit in der Human- und Tiermedizin ein großes interdisziplinäres Interesse gefunden. Nach der Todesursachenstatistik der BRD von 1982 verstarben 22,3% davon an malignen Neoplasien, denen überwiegend ein multikausales Geschehen zugrunde liegt. Es gilt jedoch als gesichert, daß ca. 15% der menschlichen Krebserkrankungen virusassoziiert sind (WOLF, 1986) und somit bundesweit 3,3% aller Sterbefälle ausmachen. Die Virusgenese unterstreicht zusammen mit allen übrigen Ätiologien maligner Entartungen die Notwendigkeit der Frühdiagnose hinsichtlich einer effektiven Therapie, einer möglichst günstigen Prognose und somit optimalen Überlebenszeit.

Da eine bestimmte virale Infektion mit onkogener Potenz ein spezifisches Antigen-Antikörper-Muster zur Folge hat und häufig über Monate oder Jahre - ja sogar Jahrzehnte - der klinischen Manifestation des entsprechenden Tumors vorausgehen kann, kommt dem serologischen Screening für die Diagnostik und Prävention eine unschätzbare Aufgabe zu.

Für diesen Zweck spielen gentechnologisch gewonnene (MOTZ, 1986) und chemisch synthetisierte Antigensets, auf deren biologische Wirksamkeit und nötige Automation bereits 1963 (MERRIFIELD, 1963) anhand eines Tetrapeptids im Modell hingewiesen wurde, eine wichtige Rolle. Diese beiden Verfahren erwecken schließlich große Erwartungen bei der Entwicklung virus- und tumorspezifischer Impfstoffe. In diesem Zusammenhang hebt MAYR (1986) vor allem die Bedeutung der Gentechnologie bei der Gewinnung von Lebendvakzinen auf der Basis sog. Rekombinantenviren hervor. Die Festphasensynthese von Oligo- und Polypeptiden mit determinierten AS-Sequenzen wurde in über 2 Dezennien weiterentwickelt und steht nun seit wenigen Jahren in vollautomatisierter Form (APPLIED BIOSYSTEMS, 1984 b) zur Verfügung.

Das Ziel der Arbeit war die chemische Synthese von 6 Antigenen des Epstein-Barr Virus (EBV) aus der Familie der Herpesviridae und deren Überprüfung im ELISA anhand verschiedener Gruppen EBV-positiver sowie -negativer Humanseren. Als Auswahlkriterien für die synthetisierten AS-Sequenzen dienten antigene Indizes, die aufgrund der bekannten DNA-Struktur des EBV-Genoms (BAER et al., 1984) in einem Computer-Programm (WOLF et al., 1987) festgelegt wurden. Mit den hergestellten Polypep-



tiden sollten Kaninchen immunisiert und die gewonnenen Seren im ELISA auf Antikörper untersucht werden. Daneben sollten die Antiseren der entsprechenden EB-viralen Peptide hinsichtlich ihres Identifikationswertes im Western Blotting, in der Immunfluoreszenz und -präzipitation ausgetestet werden.

2 SCHRIFTTUM

=====

2.1 KARZINOGENE FAKTOREN

Die Tumorentwicklung zeigt sich als ein stufenweise ablaufender Prozess, bei dem eine Zellentartung durch initialisierende Faktoren vorprogrammiert wird (PSCHYREMBEL, 1986). Je nachdem ob diese direkt am Ort der nachfolgenden Neoplasie oder entfernt davon auftreten, spricht man von lokalen bzw. resorptiven Karzinogenen. Tumorinizierende oder -promovierende Agenzien werden auch als Tumorpromotoren bezeichnet.

Ganz allgemein sind bei der Krebsentstehung 3 Hauptvariablen zu unterscheiden:

1. Art des Karzinogens (wirkungsspezifisches Karzinogen)
2. Karzinogen-Exposition (Art und Dauer der Applikation oder Einwirkung sowie das Auftreten zusätzlicher Kokarzinogene)
3. Wirts- und Gewebsdisposition (kongenital oder erworben vor dem Beginn des karzinogenen Prozesses).

Die einzelnen Karzinogene (K.) lassen sich verschiedenen Gruppen zuordnen:

1. Chemische K.: z.B. polyzyklische C-H-Verbindungen (Teer: Anthrazen und Benzpyren), Azofarbstoffe, aromatische Amine, Asbest, Arsen und Mykotoxine; TPA und n-Butyrat als Kokarzinogene
2. Pflanzenextrakte: z.B. Diterpenester aus Euphorbiaceen und Thymelaeaceen sowie Indolalkaloide (ITO, 1986)
3. Physikalische K.: z.B. Fremdkörper, UV-Strahlen und Röntgenstrahlen
4. Virale K.: onkogene Viren (Retroviridae als Vertreter der RNA-Tumoviren; Papova- und Herpesviridae als Vertreter der DNA-Tumoviren).

In der folgenden Darstellung finden als mögliches Karzinogen fast ausschließlich das EBV und damit verbundene Tumorpromotoren Berücksichtigung.

2.2 DAS EPSTEIN-BARR VIRUS

2.2.1 Klassifizierung und Charakterisierung des Epstein-Barr Virus

Das EBV gehört zu den Gamma-Herpesvirinae; bei dieser Subfamilie handelt es sich um lymphotrope Viren mit spezifischer Infektion von B- oder T-Lymphozyten. Diese können sie permanent infizieren und immortalisieren, wobei die Dauer und Art der Infektionszyklen bei den einzelnen Arten verschieden sind und eine starke Affinität zu Epithelzellen zeigen. Allen Vertretern dieser Gruppe ist eine lymphoproliferative Potenz gemeinsam, die sich einerseits in leichten und transienten, andererseits aber auch in schweren und oft letalen Lymphomen, Leukämien oder Karzinomen äußern kann.

Das humanpathogene und B-lymotrope Epstein-Barr Virus (EBV) führt in früher Kindheit zu einer latenten Infektion, die einige Jahre oder sogar Dezennien später unter Mitwirkung bestimmter Kofaktoren bei sehr wenigen Personen ein klinisches Bild mit weitreichender Tragik zur Folge haben kann. Bei älteren Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen kann eine primäre EBV-Infektion zum Pfeifferschen Drüsenfieber (PFEIFFER, 1889) führen, bei Immunsupprimierten (wie z.B. AIDS- oder Transplantationspatienten) vermag sie Lymphome zu verursachen, die in Abhängigkeit von ihrer anatomischen Lokalisation ein klinisch breites Spektrum bewirken (MILLER, 1985). Generell hat eine EBV-Infektion zu 4 verschiedenen Krankheitsbildern eine Korrelation:

1. Infektiöse Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber)

Im Verlauf dieser Erkrankung ist v.a. das lymphoide Gewebe betroffen. Es treten Lymphadenopathie und Splenomegalie, evtl. Hepatitis und ZNS-Symptome auf. Lymphknoten, Milz und Tonsillen können vergrößert sein. Fieber, Kopf- und Halsschmerzen begleiten meistens die Beschwerden der betroffenen Patienten.

2. Burkitt-Lymphom

Es kommt insbesondere in Zentralafrika bei Kindern und Jugendlichen vor (m/w = 3/1) und ist häufig in der Maxillarregion, aber auch an vielen anderen Stellen des Körpers (Leber, Brust, Nieren u.a.) lokalisiert. Im Spätstadium kann eine Penetration ins ZNS und in die Meningen möglich sein.

3. Nasopharynxkarzinom

Diese Neoplasie ist in Südchina extrem häufig. Sie hat dort im 5. Dezzennium ihre maximale Inzidenz bei einer -rate von 30-40/100.000/Jahr

und einem akkumulierten Risiko von 1%. Ihr primärer Sitz ist der postnasale Raum und sie zeigt eine auffällige Tendenz zu Lymphknoten-Metastasen. Bei uns sind ca. 5% der HNO-Tumoren NPC-Fälle. Auch hier ist im fortgeschrittenen Status ein Befall des ZNS vorzufinden.

4. Lymphome bei Immundefizienz

Normalerweise werden latent infizierte, EBV-tragende B-Lymphozyten in einem okkulten, physiologischen Mechanismus unter Kontrolle gehalten. Das Fehlen oder die Dysfunktion von Suppressorzellen vermag einen drastischen Anstieg der Virusreplikation und Zellyse zu bewirken und gewährt schließlich die Entwicklung EBV-positiver Lymphome (W. u. G. HENLE, 1982).

2.2.2 Geschichtliches zum Epstein-Barr Virus

Im Verlauf von Bemühungen, das kausale Agens für ein Lymphom aufzudecken, das als meist verbreiteter Tumor bei Kindern in gewissen Gegenden Ostafrikas galt, wurde das EBV entdeckt. Das klinische Syndrom, das seit dem Beginn des 20. Jahrhunderts Klinikern und Pathologen bekannt war, beschrieb BURKITT (1958) im Detail. Durch seine Bemühungen wurde die Krankheit zu einer klar begrenzten Einheit mit charakteristischen klinischen, pathologischen und epidemiologischen Merkmalen zusammengefaßt (BURKITT, 1958 u. 1963). Bereits 1962 vermutete BURKITT, daß das Lymphom eine virale Genese haben könnte. Die geographische Verteilung konzentrierte sich auf einen Gürtel entlang Äquatorialafrikas und war der des Gelbfiebers ähnlich. Da den Lymphomen auch die gleiche regionale Verbreitung wie der endemischen Malaria zugrunde lag, wurden zunächst Arthropoden (Moskitos, v.a. Anopheles) als Überträger des gesuchten Agens vermutet; seine Bedeutung als Kofaktor wurde bei der Pathogenese dieses Tumors in Erwägung gezogen. Die Begrenzung des Malignoms auf heiße und feuchte Regionen war auffällig; dabei handelt es sich um Gebiete unter 1800 m mit einem Jahresniederschlag über 600 mm und einer Durchschnittstemperatur über 16°C/a (W. HENLE et al., 1979). EPSTEIN et al. (1964) überprüften im Middlesex Hospital in London kultivierte Zellen aus B'-Biopsien am Elektronenmikroskop (EM). Sie fanden dabei ein Virus, das anhand seiner Struktur und doppelsträngigen DNA als Herpesvirus klassifiziert und nach seinen Entdeckern als Epstein-Barr Virus bezeichnet wurde. G. und W. HENLE fanden bei der Suche nach Antigenen, die durch indirekte Immunfluoreszenz (IF) nachweisbar waren und von BL-Patienten als AK-Quelle stammten, Virus pro-

duzierende Zellen. Die IF-Technik diente als Basis seroepidemiologischer Studien (G. u. W. HENLE, 1966). Ein großer Anteil von BL-Zellen, die aus Biopsien oder Kulturen gewonnen wurden, exprimierten ein Antigen in der Zellmembran (KLEIN et al., 1966 u. 1967). Dieses Membranantigen (MA) erwies sich als EBV-determiniert (KLEIN et al., 1968 a u. b). Daher schien das EBV ein ätiologisches Agens des BLs zu sein (W. u. G. HENLE, 1982). Alle BL-Seren zeigten eine brillante IF und einen 10fach höheren GMT als die Kontrollen.

Durch eine zufällige Beobachtung wurde das EBV beim undifferenziierten NPC für eine mögliche Ursache gehalten. Afrikanische NPC-Seren reagierten ebenso wie BL-Seren mit Extrakten von kultivierten BL-Zellen im doppelten Immundiffusionstest (OLD et al., 1966 u. 1968). Diesen Hinweis nahm das Ehepaar HENLE auf und titrierte Seren afrikanischer, chinesischer und europäischer NPC-Patienten im indirekten IF-Test. Es erzielte dabei um das 8-10fach höhere GMTs als bei Seren von gesunden Kontrollpersonen oder Patienten mit einer anderen Tumor-Lokalisation an Kopf und Hals bzw. mit anderen Tumoren des Nasopharynx (W. u. G. HENLE, 1969; W. HENLE et al., 1970).

Die offensichtliche Assoziation zwischen EBV und BL sowie NPC wurde des weiteren durch den Nachweis von EBV-DNA in nahezu all diesen Tumorbiospien belegt (zur HAUSEN et al., 1970); zusätzlich erhärtet das Vorkommen von EBNA (EBV-assoziiertes nukleäres Antigen) in diesen Tumorzellen die obige Vermutung (WOLF et al., 1973; REEDMAN et al., 1974).

Sowohl BLs als auch NPCs haben eine hohe Inzidenz in bestimmten, aber geographisch verschiedenen Gebieten (10-40/100.000/a), dennoch sind diese Tumoren selten, wenn man davon ausgeht, daß weltweit fast niemand einer EBV-Infektion entgeht (W. u. G. HENLE, 1979). Daher waren AK gegen das EBV überall auf der Erde auch bei gesunden Menschen zu finden und ließen nicht nur eine Verbindung zu den erwähnten Tumoren, sondern auch zu einer "normalen" Infektionskrankheit annehmen (W. HENLE et al., 1979). Durch ein Zufallsereignis wurde bei einer technischen Angestellten im Labor HENLE 1967 der Schlüssel zur Bestätigung dieser Vermutung gefunden: die Mitarbeiterin zeigte alle Symptome einer Erkrankung, die PFEIFFER (1889) erstmals beschrieben hatte und nach ihm bei einer charakteristischen Trias von Heiserkeit, Fieber und Lymphadenopathie im Halsbereich als sog. Pfeiffersches Drüsenfieber bezeichnet wurde. Der seronegative EBV-Befund der betroffenen Assistentin verwandelte sich im Verlauf der Erkrankung in einen seropo-

sitiven, und weiterführende Überprüfungen erwiesen EBV als prima causa der IM (infektiöse Mononukleose; G. u. W. HENLE, 1979). Dabei waren insbesondere die Beobachtungen von NIEDERMAN et al. (1970) hilfreich, die das Auftreten der IM bei Studenten an der Yale-Universität untersuchten (W. HENLE et al., 1979); sie hatten Hunderten von Studenten vor, während und nach der Erkrankung Blutproben entnommen und konserviert. Anhand dieser Seren stellte sich heraus, daß EBV-AK vor der IM nicht nachweisbar waren, wohl aber im Verlauf und nach einer derartigen Erkrankung. Somit wurde die kausale Beziehung zwischen EBV und Pfeifferschem Drüsenfieber, das jedoch die Wahrscheinlichkeit eines EBV-Malignoms bei den betroffenen Patienten nicht erhöht, zweifellos untermauert (W. HENLE et al., 1979).

Weltweit verläuft die überaus größte Anzahl primärer EBV-Infektionen in der frühen Kindheit, wo sie meist inapparent bleiben, aber ein permanentes und latentes Virusträger-Stadium entstehen lassen, das durch eine immunsuppressive Erkrankung oder Therapie aus dem Gleichgewicht geraten kann (W. u. G. HENLE, 1980). Personen mit einer reduzierten Immunabwehr, z.B. AIDS- oder Transplantationspatienten, vermögen latent EBV-tragende B-Lymphozyten nicht mehr unter Kontrolle zu halten (WOLF, 1986) und können infolgedessen evtl. EBV-positive B-Zell-Lymphome entwickeln (ZIEGLER et al., 1982). In diesem Zusammenhang wies MILLER (1985) darauf hin, daß v.a. bei Patienten mit einer kongenitalen Immunschwäche eine Tumorentwicklung nach einer primären EBV-Infektion möglich werden kann. Er begründete dies mit einem Mangel an natürlichen Killerzellen (NK), an Interferon-vermittelter Zytotoxizität, an EBV-spezifischen T-Killerzellen und synthetisierten AKs gegen EBV-Antigene.

Bereits vor mehr als 20 Jahren wurde das EBV anhand seiner Struktur und doppelsträngigen DNA als Herpesvirus eingestuft (EPSTEIN et al., 1964), die vollständige Sequenzierung seines Genoms mit 172.222 Basenpaaren gelang jedoch erst vor wenigen Jahren (BAER et al., 1984). Durch die Entdeckung der NS-Folge konnten somit auch die codierenden Genomabschnitte und ihre Aminosäuresequenzen abgeleitet werden, da aufgrund des genetischen Codes mit einem Basentriplett jeweils eine ganz bestimmte AS determiniert oder aber die Eiweißbiosynthese gestartet bzw. beendet wird (Start- bzw. Stoppcodon).

Da EBV-Infektionen und ihre typischen Erkrankungen jeweils von einem ganz spezifischen AG-AK-Muster (Antigen-Antikörper-Muster) geprägt sind (ERNBERG u. KLEIN, 1979; W. HENLE et al., 1979) und dieses bei

den EBV-korrelierten Tumorerkrankungen den klinischen Bildern lange vorausgehen kann, haben gereinigte und in vivo oder in vitro gewonnene EBV-Antigene für seroepidemiologische Überwachungen (v.a. in Hochrisikogebieten), Serodiagnostik und therapiebezogene Verlaufskontrollen EBV-assoziiierter Erkrankungen eine enorme Bedeutung erlangt. Die Gewinnung von Antigenen mit Hilfe Computer-determinierter und -selektierter Proteinregionen verspricht ein weiteres Vorankommen bei künftigen Forschungsprojekten.

2.2.3 Morphologie des Epstein-Barr Virus

Der Aufbau des EBV setzt sich in charakteristischer Weise aus 3 Teilen zusammen (W. HENLE et al., 1979):

1. Das Nukleoid im Innern des Virus hat die Gestalt eines Ringes und trägt die genetische Information in Form einer doppelsträngigen DNA. Zunächst wurde diese DNA 1970 als ein großes und linear angeordnetes Molekül mit einem (G+C)-Gehalt von ca. 59% beschrieben. Zum Nachweis des häufigen Vorkommens von EBV-DNA in BLs und anaplastischen NPCs wurde die virale DNA in einer Testserie eingesetzt (BURKITT u. WRIGHT, 1970; zur HAUSEN et al., 1970). Durch NS-Hybridisierung konnte herausgefunden werden, daß gewisse BL-Linien und in vitro transformierte Zellen EBV-Genome enthalten. Seit der vollständigen Sequenzierung (BAER et al., 1984) weiß man, daß sie sich aus 172.222 bps zusammensetzen.

2. Das Nukleoid wird von einem Kapsid umgeben. Dieses besteht aus 20 gleichseitigen Dreiecken und hat dadurch die Form eines Ikosaeders. Der so gebildete "Körper" formiert sich aus 162 tönncchenförmigen Eiweißmolekülen, den sog. Kapsomeren.

3. Die Kernmembran der Wirtszelle bildet eine Hülle, die das Viruskapsid umfaßt. Auf ihr sind zahlreiche Virus-AGs lokalisiert, die vor der Entstehung des kompletten Virus in die Membranen der Wirtszelle eingebaut werden. Bei einer Infektion fusioniert die äußere Virus-hülle mit der Zellmembran einer Target-Zelle und ermöglicht die Penetration des DNA-haltigen Viruskapsids in die Wirtszelle. Die virale DNA wird transkribiert und im Nukleus repliziert. Im Anschluß daran werden die viralen mRNAs im Zytoplasma translatiert und viele Translationsprodukte kehren dann zum Nukleus zurück, wo der Zusammenbau des Nukleokapsids erfolgt; dieses erhält schließlich eine Hülle von der äußeren Lamelle der Kernmembran (MILLER, 1985). Die virale DNA kann

entweder in der infizierten Wirtszelle in einem inaktiven, latenten Zustand verharren oder aber sie induziert die Virusproduktion; dann unterliegt die befallene Target-Zelle der Lyse und geht zugrunde.

Die Virushülle besteht aus Lipid und Protein und hebt sich im EM deutlich als großer heller Kreis vom dunkel gefärbten Hintergrund ab. Evtl. kann innerhalb der großen Kreisfläche noch ein kleiner heller Radius sichtbar werden, der das Viruskapsid darstellt (W. HENLE et al., 1979). Das komplette Virion besitzt einen Durchmesser von 180-200 nm, das Nukleokapsid dagegen nur von 100 nm (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979). Die EBV-DNA hat ein MG von ca. 101×100.000 D.

2.2.4 Biologische Eigenschaften des Epstein-Barr Virus

Die prinzipielle biologische Aktivität des EBV, die seiner Funktion bei der Pathogenese lymphoproliferativer Erkrankungen zugrunde liegt und für das Studium in Zellkulturen zugänglich ist, darf in seiner Fähigkeit zur undefinierten In-vitro-Proliferation von Lymphozyten - der sog. Immortalisation - gesehen werden. Die einheitliche Target-Zelle bei diesem Prozeß scheint der reife und mit Komplement-Rezeptoren ausgestattete B-Lymphozyt zu sein (MILLER, 1985). Die Effizienz der in vitro betrachteten Immortalisation vermag ziemlich hoch zu sein. Der Anteil transformierbarer B-Lymphozyten wird auf 10-100% geschätzt. Die Folge der einzelnen Phasen bei der Immortalisation wurde definiert. In 12 Stunden ist die virale Absorption und Penetration der B-Zellen vollzogen. Es folgt eine Reihe von Ereignissen, die mit der Synthese von EBNA ca. 6 Stunden nach der Infektion beginnt. Die EBNA-Synthese tritt vor der viralen DNA-Synthese oder deren Stimulation auf und verläuft davon unabhängig (EINHORN u. ERNBERG, 1978). Ungefähr 20 Stunden nach dem Erscheinen von EBNA wird die zelluläre DNA-Synthese angeregt (ERNBERG et al., 1976). Die ersten Mitosen Virus-infizierter Zellen können etwa 36-48 Stunden nach der Inokulation beobachtet werden. In bestimmten transformierten Zelllinien vermag die EBV-DNA ins Zellgenom integriert zu werden. So kann z.B. das EBV-Genom in latent infizierten Burkitt-Tumorzellen und transformierten B-Lymphozyten permanent persistieren (HENDERSON et al., 1983).

Es gilt als wahrscheinlich, daß sich das Virus in nicht-lymphoiden Zellen des Oropharynx einschließlich der Zellen in den Ausführungsgängen der Speicheldrüsen und anderer Epithelien des Mund-Rachen-Raums redupliziert (WOLF, 1983 u. 1986). Das EBV kann in Lymphom-Zelllinien,

die initial kein Virus enthielten, eine permanente Infektion hervorrufen; daher ist es zu erklären, daß in bestimmten EBV-positiven Lymphomen das Virus die Lymphoproliferation nicht einleitete, sondern vielmehr die Zellen zu EBV-Trägern umwandelte (MILLER, 1985).

Das EBV hat ein ziemlich begrenztes Wirtsspektrum (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979) und das biologische Merkmal der Latenz in lymphoiden Zellen (WOLF et al., 1984 a). Darunter versteht man einen Vorgang, bei dem ein gesamtes virales Genom intrazellulär in einer nicht oder teilweise exprimierten Form existieren kann. Die Latenz impliziert die mögliche Aktivierung des viralen Genoms zur Expression, eine Phase, die man als Induktion bezeichnet. Ein durch EBV transformierter Lymphozyt beherbergt latente Genome, die in einigen Zellen periodisch aktiviert werden können. Im Anschluß an die Induktion des viralen Replikationszyklus' durch verschiedene Faktoren (LUKA et al., 1978) betrachtet man eine ansteigende Menge bestimmter mRNAs und eine auffallende Zunahme virusspezifischer mRNAs.

Verschiedene Faktoren können die Viruslatenz unterbrechen und das Genom zur Expression aktivieren. Bei in vivo infizierten Zellen (z.B. BL-Zellen oder infizierten B-Lymphozyten im Blutkreislauf von IM-Patienten) bleibt das Genom im Normalfall latent; man kann EBNA nachweisen, aber nicht VCA oder Virionen (EINHORN u. ERNBERG, 1978). Bei lymphoblastoiden Zelllinien enthält die Mehrzahl der Zellen das Virus in einem latenten Zustand, und nur wenige Zellen (gewöhnlich unter 10%) werden spontan zur Virusfreisetzung aktiviert (MILLER, 1985). Das Vorkommen des spontanen Übergangs von der Latenz zur Virussynthese wird vom Alter und der Art der transformierten Wirtszelle beeinflusst. Neonatale Zellen sind hierbei weniger produktiv als adulte. Viele junge Zellen gelten als strikt latent und gestatten lediglich die Expression von EBNA, jedoch nicht die von EA. Im allgemeinen sind menschliche Zellen weniger produktiv als die vom Totenkopffäffchen oder Krallenaffen, falls sie vom selben Virusstamm transformiert werden.

Die Latenz kann, neben ihrer spontanen Unterbrechung in lymphoiden Kulturen, durch verschiedene exogene Faktoren aktiviert werden. Unter den chemisch induzierenden Agenzien befinden sich sehr unterschiedliche Komponenten wie halogenierte Uridinderivate, n-Butyrat (LUKA et al., 1978) und TPA (zur HAUSEN et al., 1978; LIN et al., 1983). Induzierende Stoffe, die identifiziert wurden, gehören zu einer Vielfalt verschiedener Klassen chemischer und physikalischer Agenzien. Einige von ihnen scheinen für gewisse EBV-tragende Zelllinien spezifisch zu

sein; beispielsweise zeigt die EB-3-Linie (W. HENLE et al., 1966) eine Zunahme der VCA-Synthese, falls man sie in einem Medium mit niedrigem Arg-Spiegel kultiviert (BECKER u. WEINBERG, 1971). Einige Linien lassen sich durch Hitze, ultraviolette Bestrahlung und Platinkomponenten induzieren. Schließlich können bestimmte Kulturen latent infizierter Zellen zur EBV-Replikation aktiviert werden, indem man diese Zellen mit Phorbol ester, n-Butyrat oder IgM-AKs inkubiert (KIEFF et al., 1982).

In Anlehnung an WOLF et al. (1984 a) sollen hier wichtige EBV-Merkmale nochmals zusammengefaßt werden:

Das EBV ist ein lymphotropes Virus, Verursacher der IM und zeigt eine Assoziation zum NPC sowie BL, was anhand von NS-Hybridisierungen bestätigt werden konnte. B-Lymphozyten erwiesen sich als Target-Zellen und vermögen beim Menschen und anderen Primaten durch EBV (in vitro) transformiert zu werden. Das Virus besitzt eine onkogene Potenz und bleibt nach einer Primärinfektion in den B-Lymphozyten des peripheren Blutes latent zeitlebens erhalten. Es ist durch eine besondere Affinität zu lymphoepithelialen Zellen, wie z.B. im Waldeyerschen Rachenring, ausgezeichnet und hat ein charakteristisches serologisches AK-Muster bei all seinen verschiedenen Krankheitsbildern (W. u. G. HENLE, 1982). EBV läßt sich aus Rachenspülungen von Personen, die eine vorhergehende EBV-Infektion hatten, isolieren (GERBER et al., 1972); dabei sind AK gegen VCA (IgG) und EBNA, jedoch nicht gegen EA nachweisbar. Laut MORGAN et al. (1979) ließ sich EBV aus dem Speichel des Parotisdgangs gewinnen. Untersuchungen von Parotisdgewebe deuteten darauf hin, daß Zellen im Lumen des Parotisdganges und in seiner Umgebung dazu in der Lage sind, einen produktiven EBV-Replikationszyklus zu unterstützen (WOLF et al., 1981; WOLF et al., 1984 b). Bisher waren EBV-Rezeptoren nur bei B-Lymphozyten nachzuweisen; diese werden während der akuten oder primären Infektion befallen. Die betroffenen Zellen treten in einen lytischen Zyklus ein und liefern einen vollen Satz viraler Antigene. Wahrscheinlich sind nicht alle B-Lymphozyten aufgrund eines zellulären Faktors, der die EBV-Expression verhindert, dazu fähig, eine vollkommen lytische Infektion zu unterstützen. Anschließend entwickeln sich AK gegen EA, VCA und EBNA. Da Immunabwehrmechanismen lytisch infizierte Zellen aus dem Kreislauf entfernen, beginnt der AK-Titer während der Rekonvaleszenzphase zu fallen. Nach einer bestimmten Zeit verschwinden die EA-AK. Wegen der EBV-Synthese in der Parotis werden Viruspartikel und intrazelluläre Virus-assoziierte Antigene (incl. EA)

in den Speichel sezerniert und gelangen in den Oropharynx. Hier können sich die viralen Partikel - außer EA - an B-Lymphozyten binden und sind dann im Organismus als Antigene vorzufinden; auf diese Weise wird der VCA-AK-Titer aufrechterhalten. Dagegen vermag EA nicht an Lymphozyten zu binden, es wird durch Proteasen abgebaut und steht dem Körper als Antigen nicht mehr zur Verfügung. Andererseits enthalten zirkulierende, latent infizierte Lymphozyten EBNA- und LYDMA-Proteine. Diese Lymphozyten sind den normalen Umsatzraten unterworfen, bei ihrem Zugrundegehen wird EBNA in den Blutstrom freigesetzt und sorgt für die Persistenz seiner Antikörper. So weisen normale Rekonvaleszentenseren niedrige VCA-IgG-AK- und EBNA-AK-Titer auf. Beim Vorliegen einer Immunsuppression, entweder infolge einer Erkrankung (z.B. M. Hodgkin) oder einer immunsuppressiven Therapie, entgehen einige der zirkulierenden peripheren Blutlymphozyten den normalerweise funktionierenden Kontrollmechanismen und treten in einen Virusreplikationszyklus ein, wobei sie einen sekundären Anstieg der EA-, VCA- und EBNA-Titer verursachen. Umweltbedingte Mutagene (BIRNBOIM, 1982) und unspezifische "Mitogene" (Malaria; BURKITT, 1969) vermögen die BL-Entwicklung zu begünstigen.

Bestimmte Pflanzenextrakte können latentes EBV induzieren und das NPC-Risiko erhöhen (ITO et al., 1981). Krotonöl aus dem Samen von *Croton tiglium* (ostasiatische Euphorbiacee) galt als eines der zuerst verdächtigten Medikamente, ist aber wegen der eingeschränkten Anwendung als Kofaktor unwahrscheinlich. Des weiteren sollen traditionelle chinesische Heilkräuter, die oft als Tees gebraucht werden, EBV-induzierende Bestandteile enthalten. Bei Bevölkerungen mit niedrigem bzw. hohem Risiko für eine NPC-Entwicklung zeigt sich ein Unterschied in der EBV-Serologie: in Hochrisikogebieten bleibt der EBV-AK-Titer im Vergleich zu Nationen mit niedrigem Risiko zeitlebens hoch. Daher könnten EBV-aktivierende Substanzen latent infizierte B-Zellen permanent zum Einstieg in einen lytischen Zyklus stimulieren, was die ständig hohen AK-Titer erklären würde. Da diese Induktion zum Absterben der Wirtszelle führt, wurde von WOLF u. SEIBL (1984) diskutiert, daß eine erhöhte Virusinduktion zu einem erhöhten Risiko der Übertragung von EBV in nicht natürliche, epitheliale Wirtszellen führt (z.B. Überfusion) und damit das Tumorrisiko erhöht. In weiterführenden Studien konnte ITO (1986) einen Zusammenhang zwischen einem hohen NPC-Risiko und der Anwendung bestimmter Pflanzenextrakte belegen und damit die multifaktorielle Pathogenese des NPCs weiter erhärten.

2.2.5 Induktion des EBV-Genoms durch pflanzliche Inhaltsstoffe

Die pflanzlichen Aktivatoren der viralen Genexpression lassen sich in 2 Kategorien einteilen: pflanzliche Diterpenester und mikrobielle Indolalkaloide, welche die bedeutendsten Tumor-Promotorsubstanzen in der Natur darstellen (ITO, 1986). Bestimmte Pflanzenextrakte und Diterpenester verstärken die EBV-Transformation. Insbesondere sind hierbei Pflanzen aus der Familie der Euphorbiaceae von Bedeutung, denn sie werden weitläufig als Heilkräuter oder "Volksmedizin" in Südchina und im tropischen Afrika angewandt, also in Regionen, wo das NPC und BL endemisch vorkommen. Als 2 wichtige Vertreter der Wolfsmilchgewächse, die beide in Südchina beheimatet sind, gelten *Croton tiglium* und *Euphorbia lathyris*. Aktive Faktoren, die in vegetarischen Diterpenestern und Euphorbiaceenextrakten enthalten sind, verstärken gewisse Phasen des EBV-Zyklus wie Infektion, Transformation, Virusproduktion und Virusaktivierung. FROHNE u. JENSEN (1973) verweisen auf den oft kautschukhaltigen Milchsaft als wichtiges Merkmal dieser Familie und erwähnen *Ricinus communis* (Wunderbaum), dessen Samen das Rizinusöl liefern und für die Verwendung in Medizin und Technik bedeutungsvoll sind. Als seine Herkunftsländer gelten Ostafrika und Indien. Bei den chemischen Inhaltsstoffen der Euphorbiaceen sind u.a. Alkaloide und hydrophile Verbindungen aus dem Krotonöl nennenswert; die letzteren stellen strukturell Diester eines Diterpenalkohols (Phorbol) dar und besitzen kokarzinogene sowie hautreizende Eigenschaften. Schließlich kommen in Wolfsmilchgewächsen z.T. giftige Proteine (Toxalbumine) vor; z.B. können wenige Samen von *Ricinus communis* durch ihren Gehalt an Rizin, einem Toxalbumin, bei Kindern tödlich wirken.

Im Rahmen seiner Arbeit hat ITO (1986) v.a. auf EBV-aktivierende und Tumor-induzierende Substanzen der Natur hingewiesen und betont dabei potente Stoffe 3 verschiedener Diterpen-Gruppen aus den Familien der Euphorbiaceen bzw. Thymelaeaceen. Er schildert insbesondere umweltbedingte EBV-Aktivatoren in Bezug auf BLs und NPCs:

Zwischen Tumor-induzierenden Substanzen (pflanzliche Diterpenester und mikrobielle Indolalkaloide) und Gebieten mit hoher BL- bzw. NPC-Inzidenz scheint ein gewisser Zusammenhang zu bestehen. Über 60 Pflanzen, die zumeist den Wolfsmilch- und weniger den Seidelbastgewächsen angehören, wachsen in diesen Regionen und werden laufend als lokale "Volksmedizin" eingesetzt. Ihre Kräuter werden getrocknet, in Puder grundiert oder mit kochendem Wasser extrahiert und dann aufgenommen.

Der Puder aus Samen von *Aleurites fordii* wird zur Behandlung nasaler Erkrankungen direkt in den Nasenraum gebracht. Personen, die in Ländern leben, wo zahlreiche Pflanzen mit EBV-aktivierenden und Tumor-induzierenden Komponenten vorkommen, können mit diesen Agenzien in verschiedener Weise kontaktieren:

1. durch Einnahme als pflanzliches Arzneimittel
2. durch Inhalation von flüchtigen Ölfraktionen
3. durch Inhalation von Blütenpollen (der genannten Pflanzen)
4. durch Inhalation von Staub aus kontaminierten Bodenpartikeln.

In 3 Ländern Ostafrikas - nämlich Kenia, Uganda und Tansania, die am östlichen Ende des "Lymphomgürtels" liegen - werden über 90 Arten von Euphorbiaceen ständig als allgemeine Volksheilmittel verwendet. Die Absude gekochter Blätter dienen als Hustensäfte, Wurzelabsude kommen als Anthelminthika gegen Cestodes und als Laxanzien zur Anwendung. Der Saft grüner Blätter soll bei frischen Wunden die Hämostase beschleunigen und derjenige von gekochten Wurzeln wird als Therapeutikum venerischer Erkrankungen getrunken. Junge Zweige von *Euphorbia tirucalli* werden geschmort und dann zur Behandlung von Angina und Magenbeschwerden gekaut.

Nach ITO (1986) liegt der annähernde Altersgipfel des BLs zwischen dem 6.-9. Lebensjahr. Über 50% der Tumoren bei afrikanischen Kindern treten im Kiefer auf und lassen für ihre Altersinzidenz 2 Vermutungen anführen:

1. die mögliche Einbeziehung eines physiologischen Ereignisses im Kindesalter
2. irgendeine Anwendung, z.B. das Kauen Tumorpromotor-haltiger Pflanzen.

Die erste Annahme könnte der Zahnwechsel, d.h. der Ersatz der Milchzähne durch eine bleibende Dentition sein. Falls man die zeitliche Verteilung des kindlichen Zahnwechsels gegen die Altersverteilung des BLs aufzeichnet, ergibt sich eine scheinbare Korrelation, die vermuten läßt, daß der Zahnwechsel eine Einleitung des BLs sein könnte. Ausfallende Milchzähne hängen oft für eine geraume Zeit am Zahnfleisch und führen in ihrer Umgebung möglicherweise zu chronischen Entzündungen. Auf diese Weise könnte sich eine begünstigte Ausbreitung von Fusobakterien und anderen Mikroben der physiologischen Mundflora, die ihrerseits Buttersäure produzieren, im infizierten Gebiet ereignen und weitere EBV-induzierende, kurzkettige Fettsäuren könnten noch hinzutreten. Es wird prinzipiell angenommen, daß die Aktivierung von EBV

in B-Lymphozyten, die in den Entzündungsraum der ausfallenden Milczähne eintreten, eine Folge EBV-induzierender, kurzkettiger Fettsäuren sein könnte; diese werden durch physiologisch vorkommende Bakterien, die mit Tumor-induzierenden, pflanzlichen Diterpenestern eine synergistische Wirkung zeigen, synthetisiert. Da die Diterpenester-haltigen Pflanzen als Volksheilmittel gegen Zahnschmerzen oder Fieber oder - was mehr zu erwarten ist - als anti-Malaria-Präparate verwendet werden, ist der Kreislauf geschlossen und die Malaria-Hypothese für die BL-Genese gut belegt, zumal man in Ostafrika EBV- und vielleicht auch Tumor-induzierende Diterpen-haltige Pflanzen als antimalarische Kräutermittel nutzt. Überall, wo dies zutrifft, wird die Malaria-BL-Assoziation unterstrichen, da Malaria und das daraus resultierende Fieber die Einheimischen zur vermehrten Aufnahme solcher Kräuter bewegen; ihre wirksamen Inhaltsstoffe werden EBV aktivieren und eine erhöhte BL-Inzidenz verursachen - falls die oben dargestellte Hypothese zutrifft.

Es wurde auch diskutiert, daß Malaria zu einem kleinen Anteil an der NPC-Entstehung beteiligt ist (ITO, 1986). Der begünstigte Wuchs von Mikroben, die EBV-induzierende Fettsäuren in ihrer Umgebung synthetisieren, hat sich durch die Isolierung solcher Bakterienarten aus Tumorherden in der Nasenhöhle von NPC-Patienten beweisen lassen. Es stehen auch epidemiologische Untersuchungen zur Verfügung, die das Vorausgehen einer nasalen Erkrankung als einen hohen Risikofaktor für eine NPC-Entwicklung angeben. Bei Menschen, die in Hochrisikogebieten leben, kann das Vorkommen vom NPC in einer späteren Lebensphase nach ITO (1986) folgendermaßen erklärt werden: ein endogener Faktor könnte mit einer exogen aktiven Substanz, die das mikrobielle Milieu in der Mukosa des Nasopharynx auf vorher beschriebene Weise erreichen kann und über längere Zeit aufgenommen wird, synergistisch wirken.

Die Wirkung von EBV-Genomen, die gewöhnlich latent in humanen lymphoiden Zellen enthalten sind, ruft den gesamten Prozeß eines malignen Wachstums beim BL und NPC hervor. Die Expression von frühen EBV-Genen durch einen Aktivierungsvorgang führt unausweichlich zum Tod der Wirtszellen. Trotzdem haben anscheinend humane Lymphoidzellen mit aktivierten frühen EBV-Genen die Fähigkeit, mit Zellen mit und ohne EBV-Rezeptoren zu fusionieren und somit aktivierte EBV-Genome auf Empfängerzellen zu übertragen (BAYLISS u. WOLF, 1980 u. 1981).

Diterpenester, die in endemischen Gebieten des BLs und NPCs als Bestandteile der Euphorbiaceen vorkommen, und andere Komponenten erhöhen

die Transformationsrate von Lymphozyten in vitro, aktivieren das EBV-Genom in nicht Virus-produzierenden Zellen (Raji), erhöhen die EA-Produkte und steigern schließlich den Gewinn an infektiösem EBV aus Produkerzellen.

2.2.6 Modus, Epidemiologie und Inzidenz einer EBV-Infektion

Faktoren, die die Infektion beeinflussen, liegen größtenteils in der Umgebung, während solche mit Einfluß auf die klinische Erkrankung im allgemeinen auf Wirtskriterien wie Alter, Immunstatus und genetische Faktoren bezogen sind. In einigen Gebieten Afrikas kommt es zu einer sehr frühen EBV-Infektion; z.B. erscheinen in Ghana EBV-AK im Alter von 1,5 Jahren bei 82% aller Kleinkinder, d.h. mit dem Verschwinden maternalen AK (EVANS, 1982 a). Auch in Neuguinea tritt die Primärinfektion sehr früh auf. Jedoch sind Kleinkinder in Abhängigkeit vom mütterlichen AK-Titer für die ersten 5-10 Lebensmonate vor einer primären EBV-Infektion geschützt (W. u. G. HENLE, 1979). Laut EVANS (1982 a) lassen sich die höchsten Verbreitungsraten in Ländern mit niedrigem sozioökonomischen und hygienischen Status vorfinden. Er faßt für die primäre EBV-Infektion folgende Manipulationsfaktoren zusammen:

Expositionsalter, geographische Lage, Hygienestatus, sozioökonomischer Status, psychosoziale Faktoren, Bildungsniveau, berufliche Tätigkeit, kulturelle Gewohnheiten und Crowding.

Bei der evtl. resultierenden klinischen Erkrankung betont er v.a. das Alter zur Infektionszeit, den genetischen und familiären Hintergrund, die physische Kondition und psychosoziale Faktoren (Motivation, akademischer Status und damit verknüpfted Leistungsdanken).

Auch KIEFF et al. (1982) weisen auf die Altersabhängigkeit der klinischen Manifestation nach einer Primärinfektion hin. Einerseits verläuft unter den niedrigen sozialen und hygienischen Bedingungen der Dritten Welt (W. u. G. HENLE, 1979) sowie weltweit die überaus größte Anzahl primärer EBV-Infektionen in der frühen Kindheit (z.B. in Ostafrika < 3.-5. Lebensjahr) und bleibt klinisch meist inapparent oder sehr mild. Nur selten entwickeln sich ernsthafte Komplikationen; so zeigen einige Kinder mit Organtransplantationen verlängerte Primärinfektionssyndrome, die sich durch polyklonale Proliferationen Virusinfizierter lymphoider Zellen auszeichnen können (KIEFF et al., 1982). Außerdem wurden Lymphomentwicklungen bei einigen immunsupprimierten Kleinkindern bereits im Rahmen des ersten EBV-Kontaktes beobachtet.

Andererseits wird in Industrieländern und Regionen mit höherem sozio-ökonomischen Status die Primärinfektion meist auf ein späteres Lebensalter verschoben und manifestiert sich dann häufig (in fast 50% der Fälle) als IM mit einem Altersgipfel zwischen dem 15.-25. Lebensjahr, wobei sich bei den Frauen ein Peak ums 16. Lebensjahr und damit 2 Jahre früher als bei den Männern abzeichnet (EVANS, 1982 a). Das Pfeiffersche Drüsenfieber zeigt in industrialisierten Ländern eine Frequenz von 45,2 Fällen/100.000/Jahr (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979).

Nach einer abgelaufenen Primärinfektion persistiert das EBV latent in einigen B-Lymphozyten per vitam und läßt sich serologisch im ELISA durch einen erhöhten anti-EBNA-IgG- (-1/40) und anti-VCA-IgG-Titer (-1/80) nachweisen (W. HENLE et al., 1979; W. u. G. HENLE, 1982). Die virale Ausscheidung in oropharyngeale Sekrete kann sich jahrelang an eine erfolgte Erstinfektion anschließen und mit einer Immunsuppression von neuem auftreten (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979). Mit ansteigendem Alter erfolgt eine Zunahme der Personen, die im Speichel - nach stattgefundener Primärinfektion - EBV sezernieren (EVANS, 1982 a).

Es ist bemerkenswert, daß eine hohe erste Infektionsrate im frühen Lebensalter gerade dort auftritt, wo BLs und NPCs endemisch vorkommen. In einer 2. Lebensphase, nämlich bei den jungen Erwachsenen, dokumentiert sich v.a. in den westlichen Ländern ein erneuter Anstieg primärer EBV-Infektionen; obwohl auch hier ein großer Anteil subklinisch verläuft, konnte bei Studenten und Soldaten die höchste Morbiditätsrate der IM festgestellt werden (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979).

Zweifellos ist bei der Übertragung ein intimer und anhaltender Austausch von EBV-kontaminierten Speichelsekreten mit Empfänglichen ein begünstigender Faktor. Er wird von EVANS (1982 a) auch als ein gemeinsamer Nenner sozioökonomischer, hygienischer, geographischer und rassistischer Unterschiede angeführt. Daher werden nach seiner Meinung sehr junge Kinder eines jeden Sozialstatus', die man in einem überfüllten Kinderhort zusammenbringt und ihnen somit den Austausch von (per Speichelsekretion) kontaminiertem Spielzeug ermöglicht, vermutlich rasch EBV-infiziert. Ein indirekter Beweis für diese stumme Infektionsrate kann durch die Zunahme der anti-VCA-IgM- (-1/160) und anti-VCA-IgG-Titer (-1/320) erbracht werden (W. u. G. HENLE, 1982). Des weiteren sollen beim Kleinkind verschmutzte Finger und kontaminierte Gegenstände bei der Übertragung eine Rolle spielen. In einigen Kulturkreisen kann das übliche Vorkauen der Babynahrung durch Mütter ein Grund für die direkte Infektion via Speichel sein (EVANS, 1982 b).

Beim jungen Erwachsenen vergrößern die Gelegenheit, Häufigkeit, Dauer und Art des Speichelaustausches - oft während des Küssens - das Infektionsrisiko, was dem klinischen Bild der IM auch die Bezeichnung "Kußkrankheit" einbrachte. Da nach neuesten Erkenntnissen jeder EBV-Infizierte EBV in den Oropharynx ausscheidet (YAO et al., 1985), stellen die Anzahl verschiedener Partner sowie die Häufigkeit und Dauer eines oralen Kontakts bedeutende Variablen für ein Infektionsrisiko dar (EVANS, 1982 a). Allerdings machen die geringen Mengen ausgeschiedener Viren bei der Erwachsenenbevölkerung EBV-Epidemien unwahrscheinlich; diesen Sachverhalt unterstreicht auch die Tatsache, daß durch eine gemeinsame Nutzung schlecht gespülten Geschirrs, per Wasser, Milch oder Respirationstrakt eine allgemeine Ausbreitung vermutlich unmöglich ist. Außerdem bleiben EBV-Infektionen in früher Kindheit meistens inapparent. Daher kann der IM, deren Übertragung fast ausschließlich durch oralen Kontakt möglich zu sein scheint, beim (jungen) Erwachsenen eine geringe Kontagiosität beigemessen werden. Der vornehmliche Übertragungsmodus von Mund zu Mund gilt bei der IM als gesichert, und die geringe Virusmenge im Speichel stimmt mit der Notwendigkeit eines längeren und intimen Speichelaustausches für eine Infektionsinduktion überein. Generell darf bei einer IM-Erkrankung eine orale EBV-Sekretionszeit von bis zu 16 Monaten nach Krankheitsbeginn angenommen werden (EVANS, 1982 b). Auch in oralen Ausscheidungen von BL-Patienten (GERBER et al., 1976) und NPC-Patienten (DESGRANGES et al., 1977) konnte EBV nachgewiesen werden.

Heute darf die IM als eine Erkrankung älterer Kinder und junger Erwachsener in Industrieländern, wo ein hoher Hygienestandard den ersten Viruskontakt bis zu diesem Alter aufschiebt, deklariert werden. So gelten die USA, Großbritannien und Skandinavien als Gebiete mit hoher Inzidenz. Durch diagnostische Maßnahmen, insbesondere den verbesserten VCA-IgM-Suchtest, wird in Entwicklungs- und tropischen Gebieten (z.B. Brasilien und Singapur) die klassische IM sogar häufig zu einem früheren Alter als in den mehr entwickelten Gebieten erkannt. Mit ungefähr 10 Jahren wurde in den meisten dieser Entwicklungsländer fast jeder EBV-infiziert, jahreszeitliche Fluktuationen konnten dabei nicht festgestellt werden. Es ist markant, daß sich bei der IM als Folge einer primären EBV-Infektion jüngere Personen schneller erholen und weniger ernsthaft erkranken als ältere. Durch den letalen Ausgang zweier IM-Fälle bei Geschwistern glaubt EVANS (1982 a) eine genetische Disposition für einen tragischen Verlauf bestätigt zu sehen. Jedoch

betonen DÜHRMANN u. SCHEELE (1986) ausdrücklich, daß die Rate schwerwiegender Komplikationen bei der IM unter 1% liegt und ein fataler Verlauf äußerst selten ist; z.B. wurden bis 1981 weltweit 108 Fälle spontaner Milzrupturen bei IM beschrieben.

EVANS (1982 b) faßt Faktoren, die eine orale EBV-Übertragung zu beeinflussen vermögen, folgendermaßen zusammen:

1. Direkte Speichelübertragung beim Küssen
2. Anzahl der Personen mit Virussekretion und Anzahl der beteiligten Partner
3. Dauer der Exkretion des Virus in den Oropharynx
4. Anzahl infektiöser Partikel und ihr Zellbindungsvermögen
5. Virusstabilität gegen Trocknung, Hitze etc.
6. Bei Kindern: sozioökonomischer und hygienischer Status
7. Bei jungen Erwachsenen: Umgangs- und Sexualverhalten beim gegensätzlichen Geschlecht.

In der gleichen Arbeit stellt EVANS (1982 b) Kriterien, die die Wirtsreaktion nach einer EBV-Infektion manipulieren, schematisch dar (Tab. 1).

	IM	BL	NPC
Alter zur Infektionszeit	spät (15-25 a)	früh (Kindheit)	(früh)?
Geographische Lage	Industrieländer	Afrika (Neuguinea)	China u.a.
Genetischer Hintergrund	wahrscheinlich	unbekannt	Chin. HLA2
Mitbedingungen	unbekannt	endemische Malaria	enterale Infektionen, toxische Chemikalien (?)
Sozioökonomische Stufe	hoch	niedrig	niedrig (?)
Verhaltensweise	intensiver oraler Kontakt, Motivation	unbekannt	unbekannt

Tab. 1: Schema einiger Kriterien, die die Wirtsreaktion nach einer EBV-Infektion manipulieren (nach EVANS, 1982 b).

Falls die EBV-Infektion in Form der IM klinisch manifest wird, läßt sich im Oropharynx stets ein pathologischer Befund erheben. Als diagnostische Trias darf die Pharyngotonsillitis mit rauhem Hals, Fieber und zervikaler Adenopathie bezeichnet werden. Dazu kann eine Gingivitis mit geschwellenem, anfälligem und blutendem Zahnfleisch auftreten. Transiente Petechien am harten Gaumen zeichnen mehr als 25% der IM-Fälle aus. Obwohl die B-Lymphozyten betroffen sind, blieb bis heute die Bedeutung des lymphatischen Gewebes (v.a. der Tonsillen) bei der Pathogenese unklar (EVANS, 1982 b).

Es gilt als gesichert, daß über 90% der Adulten EBV-positiv sind. Wenn auch einerseits die IM als Primärerkrankung solcher Infektionen anzusehen ist, erweist sie sich andererseits als Prämisse zweier Malignome. Das EBV hat eine besondere Affinität zu B-Lymphozyten und bestimmten Epithelzellen des Oropharynx sowie der Parotis. Gelegentlich erreicht es in infizierten Zellen einen lytischen Zyklus der Virusvermehrung und somit eine Freisetzung viraler Antigene (WOLF, 1986). Daraus resultiert eine Stimulation der humoralen und zellgebundenen Immunantwort. Epithelzellen in verschiedenen Differenzierungsstadien liefern die vornehmlichen Replikationsstellen für das EBV. Bei Personen mit induzierten Defekten der T-Zellantwort (z.B. AIDS) sind diese v.a. im Rachenbereich zu finden und werden als Ursache für palatinale Petechien (IM) bzw. linguale Papillen (AIDS) angesehen (WOLF, 1986). Die Epithelzellen der Speichelgänge sind für das Immunsystem unzugänglich und konnten gerade deshalb zur hauptsächlichen Virusquelle avancieren.

Schließlich muß die EBV-Infektion noch als Vorläufer des BLs bzw. NPCs gesehen werden, auch wenn sie der klinischen Erscheinung der beiden Malignome Jahre und Jahrzehnte vorausgehen kann und nur mit einer meist längerfristigen Einwirkung zusätzlicher Kofaktoren eine Karzinogenese zu induzieren vermag.

EPSTEIN und ACHONG (1979) weisen darauf hin, daß in Gebieten, wo BLs endemisch auftreten, fast die gesamte Population in einem frühen Alter mit EBV infiziert ist und hyperendemische Malaria über 50% der jungen Kinder betrifft, jedoch nur eine geringe Anzahl der doppelt infizierten Personen ein BL entwickeln. Sie bezeichnen in diesem Zusammenhang einen erhöhten anti-VCA-Titer im Vergleich zu den normalen Kontrollseren als einen größeren Risikofaktor für eine BL-Entwicklung. Nach BURKITT u. WRIGHT (1970) ist eine persistierende oder primäre EBV-Infektion in früher Kindheit ein wichtiger Faktor für die BL-Ent-

stehung. Als Kofaktoren führen sie Malaria, immunologische, nutritive, chemische und parasitäre Kriterien an und betonen die diagnostische Bedeutung des erhöhten anti-EA(R)-Titers. Umweltmutagene und unspezifische Mitogene (Malaria) sollen die BL-Entwicklung ebenfalls begünstigen (WOLF, 1983). Die größte Altersinzidenz des BLs wird mit 6-8 Jahren bei einer Frequenz von 10/100.000/Jahr in Zentralafrika angegeben (W. HENLE et al., 1979). Das Vorkommen von erhöhten Antikörpern gegen EBV-Antigene bei allen afrikanischen BL-Patienten dient als guter Hinweis auf eine kausale Assoziation von EBV mit BL (de-THÉ et al., 1978).

Bei der NPC-Entwicklung ist das Zeitintervall zur primären EBV-Infektion größer als bei der BL-Genese. In Gebieten, wo NPCs am häufigsten auftreten (Südchina, Nord- und Ostafrika, Alaska), ereignen sich die primären EBV-Infektionen vor dem 3.-5. Lebensjahr, während die maximale Tumorzinzidenz in der 5. Lebensdekade liegt (HO, 1972). Das weltweite NPC-Vorkommen beläuft sich auf 1/100.000/a, in südlichen Provinzen Chinas dagegen auf bis zu 40/100.000/a; hier gilt das NPC als die häufigste Krebserkrankung des Menschen und bis zu 1% der Bevölkerung erkranken daran (WOLF, 1986). Als ätiologische Aspekte werden genetische Faktoren, Umwelteinflüsse, bestimmte Nahrungsbestandteile und gewisse Komponenten von Volksheilmitteln (WOLF, 1986) sowie einige EBV-induzierende Chemikalien (wie TPA und Cycloleucin) angegeben; diese Stoffe steigern nach jahrelanger Einwirkung aus der Umgebung die Wahrscheinlichkeit von Fusionsabläufen mit Epithelzellen (WOLF, 1983). Die EBV-Infektion wird als notwendige Bedingung für die NPC-Pathogenese gesehen und ihre Reaktivierung kennzeichnet die Vorstufe einer malignen Transformation. Bei der erwachsenen chinesischen Bevölkerung sind erhöhte anti-EA-IgA-Titer ein prognostisches Indiz für eine nachfolgende NPC-Entwicklung. Sie dienen in der Serologie nicht nur zur Früherkennung, sondern auch zur therapeutischen Verlaufskontrolle (ZENG et al., 1983, 1984 u. 1985; ZENG, 1985).

In vitro können einige Kulturen latent infizierter Zellen zur EBV-Replikation induziert werden, indem man diese Zellen mit Phorbol ester, Butyrat oder IgM-AKs inkubiert oder mit P3HR-1-Virus superinfiziert (KIEFF et al., 1982).

Zum Schluß dieses Abschnitts läßt sich zusammenfassend feststellen: Die EBV-Infektion ist weltweit und ubiquitär verbreitet. Faktoren, die das Infektionsalter beeinflussen, beziehen sich auf die Expositionschance, die vom sozioökonomischen und hygienischen Standard einer Po-

pulation abhängt. Eine hohe Inzidenz von klinischen IM-Fällen ist primär auf solche Gebiete beschränkt, in denen die Infektion bis zu einem späteren Kindes- und frühen Erwachsenenalter aufgeschoben wird, wobei genetische und psychosoziale Aspekte bei der Entwicklung und dem Ausmaß der klinischen Erkrankung eine Rolle spielen (EVANS, 1982 a).

2.2.7 EBV-determinierte Antigen-Antikörper und ihre diagnostische Bedeutung

Aus dem breiten Literaturspektrum, das für diese Thematik verfügbar ist, soll eine kleine und konkrete Auswahl getroffen werden.

Ganz allgemein finden EBV-Antigene bei retrospektiven, diagnostischen und prognostischen (Massen-) Untersuchungen Verwendung (ZENG et al., 1985; de-THÉ u. ZENG, 1986). Ferner kommen sie bei therapeutischen Verlaufskontrollen zum Einsatz und haben für EBV-verbundene Erkrankungen sowie die EBV-spezifische Serologie eine zentrale Bedeutung erlangt. Generell sind sie durch verschiedene Methoden wie Immunfluoreszenz, Immundiffusion, Komplementbindung und Autoradiographie nachweisbar, allerdings wird sich diese Darstellung im wesentlichen auf die IF beschränken.

Die verschiedenen EBV-Antigene lassen sich in 5 Gruppen (VCA, MA, EA, EBNA u. LYDMA) untergliedern (MILLER, 1985), von denen insbesondere 3 einen eminenten Nutzen für die Serologie widerspiegeln: nämlich EA, VCA und EBNA (W. u. G. HENLE, 1982; WOLF et al., 1984 a). Außer LYDMA konnten sie alle serologisch entdeckt werden. ERNBERG u. KLEIN (1979) sprechen daher von 4 antigenen Hauptgruppen, die sich vor allem in ihrer serologischen Spezifität, ihrer zellulären Lokalisation und ihrer Expression während des viralen Zyklus unterscheiden; dazu zählen das VCA, MA und EBNA sowie der EA-Komplex.

2 Jahre nach dem ersten Beweis der EBV-Existenz per EM (EPSTEIN et al., 1964) wurden die ersten Antigenteste veröffentlicht. In Azetonfixierten Zellausstrichen von bestimmten BL-Linien wurde durch die indirekte IF ein intrazelluläres Antigen, das VCA vorgefunden (G. u. W. HENLE, 1966). Im gleichen Jahr konnten KLEIN et al. (1966 u. 1967) auf der Suche nach Tumor-spezifischen Immunreaktionen mittels indirekter IF Antikörper gegen Zellmembran-Antigene in BL-Seren und lebenden Zellen aus BL-Biopsien nachweisen. Diese MAs waren in peripheren Leukozyten, Lymphknoten oder KM-Zellen der gleichen Patienten nicht vorzufinden. W. HENLE et al. (1970) nahmen in IM-, BL- oder NPC-Seren eine

Fluoreszenz wahr, die sich proportional zur Virusdosis verhielt, und sie schlossen dabei auf den EA-Komplex. In lymphoblastoiden Zelllinien entdeckten REEDMAN und KLEIN (1973) das EBNA, welches sich nur anhand der hochempfindlichen antikomplementären IF (ACIF) aufzeigen ließ. Gegenüber anderen Nachweismethoden hat der IF-Test bei einer sauberen Durchführung die Vorteile einer einfachen Handhabung und spezifischen Aussagekraft.

Anschließend werden die verschiedenen Antigen-Gruppen im einzelnen dargestellt. Zusätzlich sollen von ihnen weitere Kriterien wie Expression, Wirts-Zellinteraktion und mögliche Induktion angesprochen werden.

2.2.7.1 Virus-Kapsid-Antigene

Da das VCA als erstes EBV-Antigen entdeckt wurde (G. u. W. HENLE, 1966), wird es in der frühen EBV-Literatur auch oft als "das EBV-Antigen" bezeichnet (ERNBERG u. KLEIN, 1979). Jeder, der von einer primären EBV-Infektion zu irgendeiner Zeit betroffen war, besitzt anti-VCA-Titer (W. u. G. HENLE, 1978). Daher zeigen abgelaufene EBV-Infektionen erhöhte anti-VCA-IgG-Titer ($-1/80$), die bei silenten infantilen Primärinfektionen noch um 2 Titrationsstufen ansteigen können und von mittelmäßigen anti-VCA-IgM-Titern ($-1/160$) begleitet werden (W. u. G. HENLE, 1982). Für sich allein läßt ein erhöhter anti-VCA-IgG-Titer keine konkrete Diagnose zu, wohl aber im Zusammenhang mit anderen Antigen-Gruppen. Allerdings sind deutliche anti-VCA-IgA-Titer ein charakteristisches Merkmal für NPC-Patienten (G. u. W. HENLE, 1976). IgA-AK gegen VCA sind regelmäßig mit der Präsenz dieses Tumors assoziiert, und ihre Überprüfung erlaubt einen frühen NPC-Nachweis in China (de-THÉ u. ZENG, 1986). Gerade beim NPC mit seinem hohen Metastasierungsverhalten - 22,1% der Patienten zeigen Fernmetastasen (KARSTENS et al., 1984) - ist die möglichst frühzeitige Erkennung im Hinblick auf das weitere Schicksal der Erkrankten eine fundamentale Aufgabe.

Bei einer Massenuntersuchung in Wuzhou City (China) konnten anti-VCA-IgA-AK 16-41 Monate vor der klinischen NPC-Diagnose nachgewiesen werden (ZENG et al., 1985). Daher gelten Personen mit einem derartigen serologischen Befund als hochverdächtig für eine sukzessive NPC-Entwicklung. Durch eine routinemäßige jährliche Überprüfung der anti-VCA-IgA-positiven Individuen kann das NPC in einer frühen Entwicklungsphase erkannt werden. Daher ist die serologische Verlaufskontrolle für

den frühen NPC-Nachweis überaus wertvoll. Bereits von WARA et al. (1975) wurde auf die erhöhten IgA-Titer beim NPC hingewiesen. Zur Frühentdeckung, insbesondere in Südostasien, entwickelten PI et al. (1985) einen sensitiven und spezifischen ELISA-Test, bei dem anti-VCA-IgA- und anti-EA-IgA-AK getestet werden. Personen mit stabilen anti-VCA-IgA-Titern bilden mit einer 1,32%igen Wahrscheinlichkeit binnen 3 Jahren ein NPC, steigt dieser Titer dagegen um das 4fache und mehr an, liegt das vermutliche Risiko einer NPC-Entwicklung innerhalb des obigen Zeitraums bereits bei 18,5% (de-THÉ u. ZENG, 1986). Da sich in endemischen NPC-Gebieten die meisten Patienten erst so spät vorstellen, daß 70% von ihnen - bereits im Stadium III und IV der TNM-Klassifikation - binnen eines Jahres nach der Primärdiagnose sterben, wird der Zweck von Massenuntersuchungen in Hochrisikogebieten deutlich, denn erst sie machen eine Frühdiagnose möglich. Auf diese Weise kann die Situation völlig umgekehrt und eine 80%ige Überlebensrate innerhalb der 5-Jahresfrist bei den frühen Stadien I und II (der TNM-Klassifikation) erreicht werden. In zahlreichen Publikationen wurde die Bedeutung des anti-VCA-IgA- und anti-EA-IgA-Nachweises für die NPC-Diagnostik hervorgehoben (G. u. W. HENLE, 1976; ZENG, 1985; ZENG et al., 1983; ZENG et al., 1984).

Im frühen Verlauf einer IM entstehen anti-VCA-IgG-Titer, die in den meisten Fällen beim ersten Arztbesuch schon in einer Höhe bis 1/80 nachweisbar sind, mit der klinischen Erscheinung auftreten und dann lebenslang persistieren. Beim Pfeifferschen Drüsenfieber erweist sich das anti-VCA-IgM als hochempfindlich und spezifisch, es begleitet das Krankheitsbild in der akuten Phase und bleibt mit einem Titer bis 1/160 über 4-8 Wochen bestehen. Anschließend fällt es wieder auf das normale Niveau zurück (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979).

BL-Patienten besitzen erhöhte anti-VCA-IgG-Titer mit einem GMT, der 8-10fach über den Kontrollgruppen liegt (G. HENLE et al., 1971 b). NKRUH et al. (1976) bewiesen, daß die Höhe der anti-VCA- und anti-EA(R)-Titer mit den Gesamtbeschwerden des BLs zusammenhängt und die AK-Muster bis zu einem gewissen Ausmaß die Prognose bestätigen.

Eine geringe Anzahl VCA-positiver Zellen korreliert mit den EBV-produzierenden Zellen, was anhand der IF, Elektronenmikroskopie und Autoradiographie demonstriert werden konnte (zur HAUSEN et al., 1967). Das VCA verteilt sich im Nukleus und Zytoplasma von Viruspartikel-enthaltenden Zellen, dagegen gerichtete AK werden erst nach der viralen DNA-Replikation produziert (ERNBERG u. KLEIN, 1979).

2.2.7.2 Membran-Antigene

Das MA wurde durch KLEIN et al. (1966) mittels indirekter IF entdeckt, allerdings ergaben nur frische und gefärbte BL-Biopsiezellen eine positive Reaktion. Es konnte bewiesen werden, daß dieses Antigen von der viralen DNA-Synthese unabhängig ist (ERNBERG u. KLEIN, 1979). Der Prozentsatz von Zellen mit positiver Membran-IF in BL-Kulturen korrelierte eng mit dem VCA-positiver Zellen. Daher durfte angenommen werden, daß es sich nicht um Tumor-spezifische, sondern um EBV-induzierte Antigene handelte (KLEIN et al., 1968 a). Auch in kultivierten Lymphoblasten aus peripheren Lymphozyten von IM-Patienten oder aus latenten EBV-Trägern lag das MA vor. Jedoch waren anti-MA-AKs nur in Seren mit anti-VCA-AKs nachweisbar und sie traten de novo in der akuten IM-Phase auf (KLEIN et al., 1968 b).

Es sind 2 Sätze von EBV-determinierten Zellmembran-Antigenen zu unterscheiden: das frühe MA (EMA), welches unabhängig von einer früheren Virus-DNA-Replikation synthetisiert wird, und das späte MA (LMA), welches in Abhängigkeit von einer vorausgehenden Virus-DNA-Replikation produziert wird (ERNBERG et al., 1974) und auf VCA-haltige Zellen beschränkt ist (W. u. G. HENLE, 1982).

Durch indirekte IF wurden 96 NPC- und Normalseren auf ihren Gehalt an anti-MA-IgG- und anti-MA-IgA-Titern getestet. Zusätzlich überprüfte man die gleichen Seren im immunenzymatischen Test (ELISA) auf anti-VCA-IgA und anti-EA-IgA. Dabei waren die in Tab. 2 angeführten Positivraten (+ in %) nachweisbar (ZHU et al., 1986).

	MA-IgG(+)	MA-IgA(+)	VCA-IgA(+)	EA-IgA(+)
48 NPC-Fälle	100 % GMT: 1/439,7	58,3% GMT: 1/7,3	100 %	64,6 %
48 Normalseren	97,9 % GMT: 1/ 94,7	0 % GMT: ---	0 %	0 %

Tab. 2: Vergleich der Positivraten von IgG- und IgA-AKs gegen das VCA und MA bei NPC- und Normalseren (nach ZHU et al., 1986).

In den meisten NPC-Seren stieg der anti-VCA-IgA-Titer höher an als der von anti-MA-IgA. Beim Einsatz von P3HR-1- oder B95-8-Zelllinien, die sich durch MA gp250 bzw. MA gp350 gegeneinander abgrenzen (EDSON u. THORLEY-LAWSON, 1983), waren im Rahmen der MA-AK-Ermittlung keine Unterschiede festzustellen. Die Positivquote von anti-MA-IgG war bei

NPC- und Normalseren sehr hoch, und obwohl der entsprechende GMT bei den Karzinompatienten wesentlich höher als bei den Gesunden lag, war dieser Test zur individuellen Diagnostik nicht verwertbar. Anders zeigte sich die Situation bei anti-MA-IgA: hier waren 58,3% der NPC- und 0% der Normalseren positiv; beim anti-EA-IgA lag ein ähnlicher Sachverhalt vor (s. Tab. 2). Obwohl der anti-MA-IgA- im Vergleich zum anti-VCA-IgA-Nachweis als NPC-Marker spezifischer, jedoch weniger empfindlich war, mußte eine sensitivere Technik für die anti-MA-IgA-Ermittlung entwickelt werden. Mit ihrer Hilfe sollte in der NPC-Diagnostik die Quote der falsch negativen Resultate beträchtlich reduziert und ein zuverlässigerer Aussagewert erreicht werden (JILG u. WOLF, 1985). Diese Absicht wurde in der anschließenden Arbeit verwirklicht.

PI et al. (1986) präabsorbierten 3 Gruppen von Humanseren mit SPA (*Staphylococcus aureus*): 48 NPC-Seren, 40 Tumorseren ohne EBV-Genese und 46 Normalseren. Sie konnten bei 100% der NPC-Patienten anti-MA-IgA-AK nachweisen mit einem GMT von 1/141. Diese AK fehlten den beiden anderen Kollektiven. Anhand dieser Methode wurde demonstriert, daß die Präabsorption von Seren durch SPA den diagnostischen Test für die NPC-Ermittlung wesentlich empfindlicher macht und zur prognostischen Überwachung von Patienten eingesetzt werden kann. Im herkömmlichen Verfahren (also ohne SPA-Präabsorption) zeigten lediglich 58,3% der NPC-Seren anti-MA-IgA-AK bei einem GMT von 1/7,3. Auch wenn das anti-MA-IgA als NPC-spezifisch erschien, war es weniger sensitiv als das anti-EA-IgA, dessen Nachweisquote (für NPCs) laut ZENG et al. (1983) über 70% erreichte. Daher war es nötig, für die NPC-Diagnostik mittels anti-MA-IgG einen zuverlässigeren Weg zu finden. Dieses Ziel wurde in der IF durch SPA-präabsorbierte Seren erreicht, weil mit ihnen der anti-MA-IgA-Suchtest zur NPC-Diagnose einen 100%igen Aussagewert erwirkte. Für diesen Zweck ist er sehr empfindlich, leicht durchzuführen und gut reproduzierbar. Außerdem eignet er sich zur Initialdiagnose und therapeutischen Verlaufskontrolle bei NPC-Patienten. Dieser Test soll bald als Screening-Verfahren bereitstehen, da ein rekombinantes MA (gp250/350) verfügbar wird (MOTZ, 1986; MOTZ et al., 1986 a), das in der Gentechnologie ökonomisch hergestellt werden kann.

Bei akut infizierten Personen und NPC-Patienten ließen sich AK gegen ein latentes MA nachweisen (WOLF et al., 1986). Dabei wurden synthetische Peptide verwendet, die man aus der Sequenz dieses MAs gewann (MODROW u. WOLF, 1986). Es scheint möglich zu sein, daß das erwähnte AG für die Kontrolle von EBV-Genom tragenden Zellen verantwortlich ist.

Auf der Basis der Pionierarbeit von W. u. G. HENLE (1979) wurde für den frühen NPC-Nachweis der Weg zur Massenapplication serologischer Testverfahren gebahnt. Insbesondere erwiesen sich IgA-AK gegen das VCA, EA und MA (ZHU et al., 1986) als sehr brauchbar für die Frühdiagnose. Die Antigene wurden bereits in groß angelegten Feldversuchen eingesetzt, um ihren Einfluß auf die NPC-Kontrolle zu bestätigen (ZENG et al., 1985). Die Ergebnisse sind sehr ermutigend (s. Tab. 3; de-THÉ u. ZENG, 1986; WOLF et al., 1986).

		T N M - S t a d i e n				Total
		I	II	III	IV	1101
Ambulante Patienten	n	18	312	556	180	1060
	%	1,7	29,3	52,2	16,8	100
Serologisch getestete Patienten	n	15	17	3	0	35
	%	42,8	48,6	8,6	0	100
5-Jahres-ÜLZ	%	93,3	74,7	43,0	11,0	

Tab. 3: Vergleichende Darstellung klinischer NPC-Stadien, die in der Poliklinik von Wuzhou oder serologischen Reihenuntersuchung diagnostiziert wurden (nach de-THÉ u. ZENG, 1986).

Die serologische Untersuchung führte in 91,4% zu einer NPC-Entdeckung im Stadium I/II, während die ambulante Vorstellung bei der gleichen TNM-Klassifikation nur eine Aufdeckungsrate von 31% aufweisen konnte. Nach BÖTTCHER et al. (1984) haben NPCs eine 5-Jahres-ÜLZ von ca. 35%. Diese Quote läßt sich laut WOLF et al. (1986) durch ein serologisches Massen-Screening in Hochrisikogebieten um 57% auf über 90% steigern. Doch sind für diesen Zweck IF- oder enzymatische Tests (ELISAs) auf lange Sicht aus mehreren Gründen nicht anwendbar, denn erstens ist die Antigenproduktion bei einer unterschiedlichen Qualität teuer, und zweitens handelt es sich um arbeits- und zeitaufwendige Verfahren, die teure Mikroskope und erfahrenes Personal erfordern. Daher wurde die rekombinante DNA-Technologie mit gutem Erfolg zur Entwicklung neuer Testsysteme mit reineren Antigenen eingesetzt (WOLF et al., 1986). Durch die Immunpräzipitation von EBV-Proteinen wurden Antigene identifiziert, die zum Nachweis des Immunstatus' und zur Charakterisierung EBV-spezifischer Erkrankungen von Bedeutung sind (WOLF et al., 1984 c). Im Rahmen der Kartierung von EBV-Proteinen auf dem Genom ließ sich nachweisen, daß B95-8-Zellen meistens das MA gp350

und P3HR-1-Zellen meistens das MA gp250 produzieren (SEIBL u. WOLF, 1984).

Nach der Subklonierung in Expressionsvektoren konnte gp250/350 als MA in *E. coli* exprimiert werden und steht nun für diagnostische Zwecke zur Verfügung (MOTZ, 1986). Jedoch müssen in *E. coli* gewonnene Antisera von kontaminierenden Bakterienproteinen gereinigt werden, bevor sie in der Diagnostik verwertbar sind. Außerdem ist eine effektive Anwendung nur bei schnellen und billigen ELISAs gegeben, die zu Massenkontrollen von Hochrisikokollektiven geeignet sind. Durch das große MA (gp250/350) wurde eine Zunahme neutralisierender AK beim Menschen und Versuchstier induziert (MORGAN et al., 1979). Das dafür codierende Gen (gp250/350) konnte auf dem viralen Genom kartiert werden (HUMMEL et al., 1984; SEIBL, 1985) und scheint nach angemessener Reinigung zur Immunisierung brauchbar zu sein.

Auch wenn zur Eindämmung EBV-korrelierter Krankheiten die Prophylaxe als Idealziel gilt, ist die Früherkennung von immenser Bedeutung, da die meisten NPC-Patienten der kommenden 50 Jahre schon EBV-infiziert sind und am besten durch eine kontinuierliche Überwachung EBV-induzierter AK geschützt werden (WOLF et al., 1986).

2.2.7.3 Früher Antigen-Komplex

Bei der Untersuchung von IM-, BL- oder NPC-Seren zeigte sich noch nach 1-2 Tagen eine Fluoreszenz, die sich zur gesamten Virusdosis ziemlich proportional verhielt (W. HENLE et al., 1970). Zwar befinden sich die viralen Genome gewöhnlich in einem reprimierten Zustand, jedoch können sie durch Butyrat (LUKA et al., 1978) und Phorbol ester (zur HAUSEN et al., 1978) induziert werden. Unter diesen Bedingungen wird die Synthese von EA in einer beachtlichen Zellzahl veranlaßt und führt oft auch zur Synthese von VCA sowie infektiösen Viruspartikeln (W. u. G. HENLE, 1982).

Das EA kann in 2 Komponenten unterteilt werden (G. HENLE et al., 1971 a), die sich in ihrer serologischen Spezifität und zellulären Verteilung unterscheiden. EA(R) ist aufs Zytoplasma beschränkt, und die spezifischen AK erreichen beim BL oft beachtliche Titer (-1/160). Bei stummen Primärinfektionen in der frühen Kindheit weist anti-EA(R)-IgG mäßig erhöhte Titer auf (-1/40; W. u. G. HENLE, 1982). Dagegen wird das EA(D) im Nukleus und Zytoplasma vorgefunden (G. HENLE et al., 1971 a). Anti-EA(D)-IgG steigt bei der IM vorübergehend an (-1/40) und

erreicht beim NPC Werte bis 1/80 (W. HENLE et al., 1979). Ein anti-EA(D)-IgA-Titer (-1/40) ist für Tumoren im Nasenrachen geradezu charakteristisch. Bei Gesunden fehlen gewöhnlich beide EA-Komponenten oder sie sind in niedrigen Titern bei relativ hohen VCA-Konzentrationen nachzuweisen. Als Besonderheit zeigten BL-Seren häufiger anti-EA(R)-IgG oder anti-EA(R+D)-IgG als anti-EA(D)-IgG allein. Der anti-EA(R)-Titer vermag beim BL sogar den von anti-VCA zu überschreiten (G. HENLE et al., 1971 b). NPC-Patienten besitzen oft beide EA-Komponenten, wobei das anti-EA(D) jedoch deutlich dominiert (ERNBERG u. KLEIN, 1979). Obwohl die Gründe dieser Unterschiede noch nicht bekannt sind, haben sie eine gewisse diagnostische und auch prognostische Relevanz.

Die beiden EA-Komponenten lassen sich auch hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber bestimmten Fixationsmitteln unterscheiden. Die R-Komponente wird durch 95%iges Äthanol oder Methanol denaturiert, sie bleibt jedoch bei Azeton erhalten. Das EA(D) übersteht sowohl die Alkohol- (Methanol-) als auch die Azeton-Fixation, allerdings läßt es sich durch proteolytische Enzyme leichter verdauen als das R-Antigen. Im allgemeinen ist es nicht möglich, EA(D) ohne EA(R) zu denaturieren (W. u. G. HENLE, 1982). Das Erscheinen von EA gilt als erstes definitives Zeichen, daß die betroffene Zelle in den lytischen Zyklus eingetreten ist (GERGELY et al., 1971). Die Produktion des EAs verläuft unabhängig von der DNA-Synthese.

Beim Pfeifferschen Drüsenfieber erreicht das EA(D) sein Maximum 3-4 Wochen nach Krankheitsbeginn und persistiert über 3-6 Monate, während das EA(R) 2 Wochen bis einige Monate nach dem Einsetzen von IM auftreten und 2 Monate bis über 3 Jahre bestehen kann. Gelegentlich begleitet die EA(R)-Komponente ungewöhnlich ernsthafte oder protrahierte IM-Erkrankungen (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979). Transientes anti-EA(D)-IgG soll bei über 85% der IM-Patienten vorzufinden sein (W. u. G. HENLE, 1979).

Während im Stadium I-II des Nasen-Rachen-Karzinoms anti-EA(D)-Titer häufig vorliegen, treten sie in den Stadien III-V stets auf. Diese AK nehmen zusammen mit den anti-VCA-Mengen und den gesamten Tumorbeschwerden zu (W. u. G. HENLE, 1979), dagegen sind ihre abnehmenden Konzentrationen ein wertvolles Indiz für einen effektiven Therapieverlauf. Beim EA(D) und VCA muß eine Erhöhung und Verbreiterung des AK-Spektrums als sehr verdächtig gewertet werden und zur frühen Tumorsuche veranlassen (BORNKAMM, 1984). Dabei stellt die anti-EA-IgA-Überprüfung zur NPC-Ermittlung einen besseren Parameter dar als die

des anti-VCA-IgA (de-THÉ u. ZENG, 1986). Hierzu muß erläutert werden, daß nur 10% der NPC-Patienten im Stadium I das anti-EA-IgA aufweisen im Vergleich zu 45% bei anti-VCA-IgA, was mittels indirekter IF belegt wurde. Im immunenzymatischen Test zeigten sogar nur 15% der NPC-Seren aus China nachweisbare anti-EA-IgA-AK. Aber ZENG et al. (1983) entwickelten den anti-EA-IgA-RIA, bei dem sie ¹²⁵J-markiertes antihumanes IgA einsetzten und anti-EA-IgA-AK in 96% der NPC-Seren nachwiesen. Somit konnten 4% der Fälle durch dieses Verfahren nicht erfaßt werden. Ein sensitiverer Test sollte diese Problematik überwinden.

PI et al. (1985) entwickelten einen ELISA-Test, der das Screening in Südostasien, wo das NPC unter den Karzinomen die Haupttodesursache bei Männern darstellt, erleichtern sollte. Es handelt sich um eine einfache und billige sowie spezifische und empfindliche Methode zur Frühdiagnose von NPCs in Regionen mit hoher Inzidenz, wobei die Verwendung von anti-EA-IgA der von anti-VCA-IgA vorzuziehen ist. Diese EBV-Marker ermöglichen nicht nur die Frühentdeckung zu einem Zeitpunkt, wo die kurative RT vermutlich noch erfolgversprechend ist, sondern sie dienen auch der Festlegung von Vorbedingungen, die der Reihe nach neue Möglichkeiten zur antiviralen und -tumorösen Prävention eröffnen (de-THÉ u. ZENG, 1986).

Durch die Präabsorption mit SPA zeigten NPC-Seren beim immunenzymatischen Test eine 100%ige anti-EA-IgA-Rate, der nur 77% bei der unbehandelten Gruppe (ohne serologische SPA-Präabsorption) gegenüberstehen (PI et al., 1986). Mittlerweile sind für die NPC-Serologie auch 2 EAs (p138 und p54) verfügbar, die in E. coli exprimiert wurden und vor allem zur Bestimmung der anti-EA-Titer diagnostisch verwertbar sind (WOLF et al., 1986). Abschließend soll nochmals hervorgehoben werden, daß EBV-spezifische IgA-AK, die gegen das VCA und EA gerichtet sind, ein hervorragendes Merkmal des NPCs darstellen (G. u. W. HENLE, 1976).

2.2.7.4 EBV-assoziiertes nukleäres Antigen

EBNA wurde ursprünglich im Nukleus von allen EBV-Genom tragenden Zelllinien in vitro und in BL-Biopsiezellen entdeckt (REEDMAN u. KLEIN, 1973; REEDMAN et al., 1974). Anschließend wurde es in Epithelzellen von NPC-Biopsien nachgewiesen (HUANG et al., 1974). BL- und NPC-Gewebsentnahmen sowie Zellkulturen, die EBV-DNA enthielten, zeigten ebenfalls EBNA-positive Zellen. Bei IM-Patienten konnten während der frühen und akuten Phase EBNA-positive lymphoide Zellen vorübergehend

im zirkulierenden Blut nachgewiesen werden (KLEIN et al., 1976). Mit Ausnahme von Patientenseren der akuten IM-Phase oder von Patienten mit einigen T-Zelldefekten waren anti-EBNA-AK fast einheitlich in anti-VCA-positiven Seren vorhanden (G. HENLE et al., 1974). Trotz einiger Abweichungen war das EBNA nicht durch direkte oder indirekte IF nachweisbar, jedoch ließ es sich durch die ACIF im Nukleus aller EBV-transformierten Zellen finden.

Die EBNA-Induktion geht der stimulierten DNA-Synthese voraus und gilt als der erste und einzig nachweisbare virale Prozeß während der primären EBV-Infektion humaner Lymphozyten (EINHORN u. ERNBERG, 1978). Es ist durchaus denkbar, daß EBNA die Transformation initiiert und/oder das Transformationsstadium der Zellen aufrecht erhält (ERNBERG u. KLEIN, 1979). Seine autonome Expression, die mit der Anzahl viraler Genome verbunden ist, läßt eine regulatorische Funktion vermuten. Generell darf festgestellt werden, daß EBNA als intranukleäres AG in allen bekannten EBV-infizierten und -transformierten Zellen vorkommt. Es soll als Repressionsprotein die lytische Expression verhindern (WOLF et al., 1984 a).

Im speziellen zeigen NPC-Patienten einen ziemlich hohen anti-EBNA-IgG-Titer ($\sim 1/160$; W. u. G. HENLE, 1979). Da die Zellen dieses Tumors stets EBNA exprimieren (WOLF et al., 1973), hat es eine diagnostische Begleitfunktion. Wegen seiner lebenslangen Persistenz ist EBNA für abgelaufene EBV-Infektionen ein wichtiges Indiz und erreicht als anti-EBNA-IgG Titrationsstufen bis $1/40$ (W. HENLE et al., 1979).

Bei der IM sind in der akuten Phase, d.h. in der 1. Krankheitswoche, 5-20% der zirkulierenden B-Zellen EBNA-positiv, in der 2. Woche dagegen nur noch 2%. Diese Zellen zirkulieren im Blut und synthetisieren Igs (MILLER, 1985). Dies macht verständlich, warum bei der IM erst einige Wochen bis Monate nach Krankheitsbeginn und damit zumeist nach erfolgter Genesung anti-EBNA stufenweise ansteigt und dann aber per vitam bestehen bleibt. Diese AK haben durch ihr spätes Erscheinen für die IM doch einen diagnostischen Wert (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979), da ihr Nachweis erst ab der Konvaleszenzphase erbracht werden kann (VONKA et al., 1972).

Beim BL konnten zur HAUSEN et al. (1970) EBV-DNA in Tumorbiopsien und EBNA in Lymphomzellen vorfinden. Die anti-EBNA-Titer umfassen hier einen weiten Bereich und zeigen einen GMT von ca. $1/40$ (W. u. G. HENLE, 1982). Vor allem kommt dem anti-EBNA-IgG als Kofaktor in der BL-Diagnostik eine wichtige Bedeutung zu.

2.2.7.5 Lymphozyten-determiniertes Membran-Antigen

Anti-LYDMA-AK wurden bisher im Organismus nicht nachgewiesen, jedoch kann die zelluläre Immunabwehr mit Hilfe des LYDMAs infizierte B-Lymphozyten erkennen und eliminieren. Die im Körper zirkulierenden und latent transformierten B-Lymphozyten exprimieren vermutlich nur EBNA und LYDMA (SEIBL, 1985). Wahrscheinlich erscheint LYDMA in einem Frühstadium der EBV-induzierten B-Lymphozyten-Transformation. Es ist denkbar, daß anti-LYDMA-Effektorzellen beim Stoppen des lymphoproliferativen Prozesses bei der akuten IM eine bedeutende Rolle spielen, denn in dieser Phase tauchen T-Killerzellen mit einer anti-LYDMA-Aktivität auf und verschwinden wieder während der Rekonvaleszenz (ERNBERG u. KLEIN, 1979). Offenbar sind die Interaktionen zwischen den EBV-Genom tragenden B-Lymphozyten und den LYDMA-sensitiven T-Zellen für die klinische Symptomatik der IM (wie z.B. Tonsillitis, Pharyngitis, Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie) verantwortlich (W. u. G. HENLE, 1982).

Dagegen konnte bei Patienten mit EBV-korrelierten BL- und NPC-Tumoren keine anti-LYDMA-Reaktivität in der T-Zellfraktion des peripheren Blutes nachgewiesen werden. Jedoch war eine kleine Anzahl LYDMA-reaktiver Effektorzellen aus Tumorgewebe und/oder ableitenden Lymphknoten zu isolieren. Eine geringe Menge war auch stets in EBV-assoziierten malignen Zellverbänden vorzufinden (JONDAL et al., 1975).

Grundsätzlich verteilt sich LYDMA auf der Zelloberfläche aller EBV-tragenden Zelllinien und kann dem Immunsystem gewissermaßen als "Erkennungsmarke" dienen. Zwar hat dieses AG in der serologischen Diagnostik bisher keine Bedeutung erlangt, aber es besitzt eine Induktionspotenz für eine zellvermittelte Immunität. Daher wird man zweifelsohne versuchen, anhand der erfolgten Identifikation von LYDMA und MA Vakzine-antigene mittels rekombinanter DNA-Technologie herzustellen. Diese Impfstoffe könnten hinsichtlich ihrer prophylaktischen Wirkung zuerst bei experimentell infizierten und lymphoproliferativ erkrankten Neuweltaffen erprobt werden (MILLER, 1985).

2.2.7.6 Heterophile Antigene

Im Verlauf der IM entwickelt sich transient eine beachtliche Anzahl heterophiler AK, die meist der IgM-Klasse angehören. Diese AK sind gegen Schafs-, Rinder- und Pferde-Erythrozyten gerichtet und liefern ein bedeutendes diagnostisches Hilfsmittel. Jedoch sind die Aggluti-

nine der Schafs- und Pferde-Erythrozyten und die Hämolysine der bovinen roten Blutzellen (RBCs) die häufigsten und zumeist erforschten heterophilen IgM-AK (G. u. W. HENLE, 1979). Diese AK agglutinieren RBCs von Schafen oder Pferden und wurden an der Yale-Schule für Medizin von PAUL u. BUNNELL (1932) bei IM-Patienten entdeckt.

Die heterophilen Agglutinine des PBTs gelten - mit sehr wenigen Ausnahmen - als hoch IM-spezifisch und sollen in > 90% der klinischen Fälle vorhanden sein (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979), so daß ihr Nachweis für die IM-Diagnose als pathognomonisch betrachtet werden kann (W. HENLE et al., 1979; DAVIDSOHN u. LEE, 1969). Dabei erreichen die IgM-AK gegen das heterophile AG einen GMT bis zu 1/640 (W. u. G. HENLE, 1982). Im Gegensatz dazu sind diese Titer bei silenten infantilen Primärinfektionen nur leicht erhöht und steigen erst mit zunehmendem Alter der Patienten an (FLEISHER et al., 1979). Deshalb können falsch negative Resultate des PBTs v.a. bei sehr niedrigen heterophilen AK-Titern beobachtet werden, und falsch positive Ergebnisse vermögen gelegentlich ebenfalls aufzutreten (G. u. W. HENLE, 1979).

Durch die Präsenz heterophiler AK im Serum werden Erythrozyten vom Schaf und Rind hämolysiert. Der PBT dient zum Konzentrationsnachweis oviner RBC-Agglutinine und bleibt bis zur 6.-8. Woche nach Krankheitsbeginn positiv. Gewöhnlich lassen sich heterophile Agglutinine oder bovine Zellhämolysine schon während der 1. Krankheitswoche erfassen, manchmal zeigen sie sich erst später und bei einer geringen Anzahl von IM-Patienten erscheinen sie überhaupt nicht. Konkret wird angenommen, daß ca. 10% der Jugendlichen und jungen Erwachsenen und ein größerer Prozentsatz an Kindern im Rahmen der IM keine heterophilen AK aufweisen, insofern ihre Seren im PBT gegen Hammelblut-Agglutinine getestet werden. Obwohl im empfindlicheren equinen RBC-Test die Quote an Nicht-Reagenten geringer ist, bleibt die EBV-assoziierte IM ohne heterophile AK-Reaktion im PBT eine Tatsache (HORWITZ et al., 1977).

Nach dem Einsetzen der IM können heterophile AK in stufenweise abnehmenden Titern über viele Monate oder sogar ein Jahr hinweg bestehen, wobei die bovinen Zellhämolysine vor den equinen RBC-Agglutininen verschwinden (G. u. W. HENLE, 1979). Jedoch bleiben sie bei heterophilen AK-negativen IM-Fällen, die v.a. in der Kindheit häufig vorkommen, und bei IM-ähnlichen Erkrankungen unumgänglich (W. u. G. HENLE, 1979). Diese sind teils durch EBV bedingt, häufiger aber durch das Zytomegalievirus (CMV) und gelegentlich durch das Adenovirus, andere Viren oder Toxoplasma gondii als Gattung zystenbildender Kokzidien (HORWITZ

et al., 1977). Außerdem zeigen primäre EBV-Infektionen ein breites Spektrum klinischer Reaktionen und eine Vielfalt an Schwierigkeiten, die verschiedene Organe einbeziehen. Sie können den typischen IM-Symptomen folgen, sie begleiten, ihnen vorausgehen und manchmal sogar das einzige klinische Merkmal darstellen. Trotz des Nachweises heterophiler AK wird daher ärztlicherseits oft die Bestätigung der IM-Diagnose mittels EBV-spezifischer Serologie gewünscht (G. u. W. HENLE, 1979).

Ein heterophiler AK-Titer im PBT von 1/10 bis 1/40 soll als negativ, ein solcher von 1/80 bis 1/160 als verdächtig und schließlich derjenige $\geq$ 1/160 als positiv zu werten sein. Für die Beurteilung ist allerdings der Titeranstieg zwischen 2 Blutentnahmen entscheidend (HAAGEN, 1974). Bei den EBV-korrelierten Malignomen sind heterophile AK-Nachweise negativ und daher in der EBV-Serologie ohne jegliche diagnostische Relevanz.

2.2.7.7 EBV-neutralisierende Antikörper

Wahrscheinlich sind sie zumindest teilweise mit den anti-MA-Komponenten identisch. Die Bestimmung neutralisierender AK-Titer wird wegen des komplexen Vorgangs nicht extensiv durchgeführt. Sie wäre zum Nachweis des Immunstatus einer bestimmten Population zwar das Mittel der Wahl, aber glücklicherweise besitzen anti-VCA-positive Seren auch - mit sehr wenigen Abweichungen - EBV-neutralisierende AK, und Seren mit neutralisierenden AKs, aber fehlenden anti-VCA-Titern, wurden niemals beobachtet (HEWETSON et al., 1973). Neutralisierende AK wurden sowohl bei gesunden Personen als auch bei IM-Patienten vorgefunden. Hier erscheinen anti-VCA und anti-EA(D) bereits im akuten Stadium sehr früh. Bei der IM treten neutralisierende AK 3-4 Wochen nach Krankheitsbeginn auf und persistieren bei abgelaufenen Infektionen dann lebenslang (W. u. G. HENLE, 1982). Wegen ihres technisch schwierigen Nachweises haben sie bisher kaum eine diagnostische Bedeutung erlangt (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979).

2.2.7.8 Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität

Die in diese Reaktion einbezogenen AK sind wie die EBV-neutralisierenden AK gegen EBV-determinierte frühe oder späte MAs oder gegen beide gerichtet (JONDAL, 1976). Als Effektorzellen dienen Lymphozyten ohne B- und T-Zellmarker. Der ADCC-Test ist für die Messung der anti-MA-

Titer empfindlicher als der IF-Test. Das späte MA scheint der Angriffspunkt der ADCC-Reaktion zu sein. Dies könnte erklären, warum EA- und VCA-positive Zellen in BL- oder NPC-Biopsien nicht nachweisbar sind (W. u. G. HENLE, 1982).

Nach der Genesung von IM werden EBV-spezifische Killerzellen vermutlich nie völlig eliminiert, sie persistieren in einer Anzahl, die mit den gegenwärtigen Mitteln nicht belegbar ist. Irgendwann werden einige der EBV-tragenden B-Lymphozyten spontan induziert, um genügend MA, VCA und Viruspartikel zu synthetisieren. Gewöhnlich wird nicht genügend EA hergestellt, um eine Produktion entsprechender AK aufrechtzuerhalten. Bevor frühes und/oder spätes MA auf der Zelloberfläche erscheinen, können sie vor dem vollen Ingangkommen der Antigensynthese durch NK-Zellen oder ADCC zerstört werden. Andere EBV-tragende Zellen werden durch LYDMA-sensitive T-Killerzellen kontinuierlich vernichtet, wobei genügend EBNA für eine persistente AK-Stimulation freigesetzt wird.

NPC-Patienten mit einem hohen ADCC-reaktiven AK-Titer, der gegen EBV-determinierte MAs gerichtet ist, haben wahrscheinlich eine Chance, ohne Krankheitsanzeichen längerfristig zu überleben, während solche mit sehr niedrigen Titern dem Tumor zu unterliegen scheinen (W. u. G. HENLE, 1982). Zu dieser Schlußfolgerung führt auch eine Darstellung von KLEIN (1979):

Es wurden ADCC-Tests mit afrikanischen NPC-Seren durchgeführt, die gegen EBV-superinfizierte, MA-positive Raji-Target-Zellen geprüft wurden. Dabei erfolgte eine Aufteilung der Spender in 2 Gruppen: die eine umfaßte Personen, die binnen 2 Jahren nach der Diagnosestellung verstarben, die andere sprach auf die Therapie gut an und überlebte mehr als 2 Jahre nach der NPC-Erkennung. Dabei war der ADCC-GMT bei der Überlebenden Gruppe signifikant höher als bei der nicht Überlebenden (1/5410 respektive 1/615). Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, daß die ADCC-Titer bei NPC-Patienten von prognostischem Wert sein könnten. Im Gegensatz zu den anti-EA- und anti-VCA-IgA-Titern scheinen hohe ADCC-Titer Indikatoren für eine relativ gute Prognose darzustellen, während niedrige auf eine schlechte hinweisen. Es ist denkbar, daß anti-MA-Titer bei der Immunität gegen diesen Virus-assoziierten Tumor eine aktive Rolle spielen. Um dies zu dokumentieren, postulierte KLEIN (1979) den Nachweis von MAs in NPC-Zellen, der mittlerweile vollzogen wurde (WOLF et al., 1986).

2.2.7.9 Antigen-Expression bei EBV-tragenden Zelllinien

Alle EBV-DNA tragende Zelllinien exprimieren eines oder einige der oben beschriebenen EBV-Antigene. Davon ist EBNA das einzige Antigen, das universal in EBV-DNA enthaltenden Zellen vorkommt. Die 3 anderen serologisch entdeckten Antigene (MA, EA, VCA) werden nur in Linien exprimiert, die EBV produzieren. Sie werden in einer variablen und i.d.R. sehr geringen Zellzahl exprimiert. EA und VCA werden nur in Zellen exprimiert, die in den lytischen Zyklus eingetreten sind, während MA mit einer größeren Zellzahl assoziiert ist (ERNBERG u. KLEIN, 1979).

Gewöhnlich ist die Anzahl von EA- und VCA-produzierenden Zellen niedrig und überschreitet nur selten 10%. Die Zelllinien können eine relativ konstante Anzahl EA- und VCA-positiver Zellen beibehalten, dennoch vermögen sie auch in den Nonproducer-Status im Laufe der Zeit zu wechseln. Die Anzahl Virus-produzierender Zellen spiegelt die Frequenz der spontanen Induktion des viralen Zyklus' wider. Diese tritt anscheinend mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit innerhalb einer proliferierenden Stammlinie auf, sie ist jedoch für jede anders.

Die verschiedenen Linien unterscheiden sich nicht nur in der Anzahl Virus-produzierender Zellen, sondern auch im Ausmaß, zu dem der Viruszyklus vor dem Zelltod fortschreiten kann. In einigen Linien tendieren die Zellen dazu, um die EA-Produktion herum oder kurz danach und nur selten später einzugehen. In anderen Linien entwickeln sie sich bis zum VCA, ohne dabei unbedingt infektiöse Viruspartikel zu produzieren (ERNBERG u. KLEIN, 1979).

2.2.7.10 Expression von EBV-Antigenen während des viralen Zyklus'

Mit Hilfe der Doppel-IF-Technik konnten ERNBERG et al. (1976) zeigen, daß das EBNA der EA-Synthese vorausgeht, das EA zuerst im Nukleus erscheint und sich von dort später in der ganzen Zelle ausbreitet. Wie bereits erwähnt wurde (s. 2.2.7.3), verläuft die EA-Synthese von der viralen DNA-Synthese unabhängig.

Der Viruszyklus selbst dauert ca. 12 h, bevor das VCA als spätes Antigen erscheint. Die ersten EA-positiven Zellen treten nach 6 h auf, und die virale DNA repliziert sich nach 2 weiteren Stunden. Das frühe MA erscheint annähernd zur gleichen Zeit wie das EA und ist an die virale oder zelluläre DNA-Synthese nicht gebunden, jedoch wird das

späte MA nur in Zellen exprimiert, die bereits die virale DNA repliziert haben (ERNBERG et al., 1974). Da das VCA nur in EA-positiven Zellen erscheinen kann, hängt seine Synthese von der des EAs ab. Zwar ist die Produktion von EA eine notwendige, aber per se ungenügende Voraussetzung für die VCA-Synthese (ERNBERG u. KLEIN, 1979).

Unter den Agenzien, die die Zahl der EA- (und manchmal VCA-) positiven Zellen in Producer-Zelllinien erhöhen (induzieren), nannten ERNBERG u. KLEIN (1979) folgende:

TPA (zur HAUSEN et al., 1978), Bestrahlung (ERNBERG, unveröffentlicht), Mitomycin C, Arg-armes Medium und niedrige Temperaturen (33°C).

2.2.7.11 EBV-spezifische Antigen-Antikörper-Muster

Durch die EBV-spezifische Serologie konnte der Nachweis erbracht werden, daß IM, BL und NPC EBV-assoziiert sind. Jede dieser Erkrankungen ruft ihr eigenes und charakteristisches AK-Spektrum verschiedener Ig-Klassen gegen einige EBV-determinierte Antigene hervor, und dieses Spektrum dient schließlich zur Bestätigung der klinischen Diagnose. Es erlaubt des weiteren auch eine prognostische Information über die verschiedenen Tumorpatienten (mit EBV-Bezug) und kann zur Verlaufskontrolle einer wirksamen Therapie eingesetzt werden.

Da es nicht einfach ist, rein deskriptiv die diversen AG-AK-Muster mit alternierenden Igs bei allen EBV-Erkrankungen zusammenhängend und übersichtlich darzustellen, wird dies anschließend - in Anlehnung an 2 Publikationen - graphisch versucht. Es muß aber hinzugefügt werden, daß in praxi Abweichungen von diesem Schema möglich und Ausnahmen (Sonderfälle) sowie sehr kurzfristige transiente Titer in diese Abbildung (Abb. 1) nicht aufgenommen sind.

2.2.8 Wege zur Identifizierung und Herstellung antigenen Regionen

Anhand eines Computer-Programms (CHOU u. FASMAN, 1974 a u. b) läßt sich die Sekundärstruktur eines Proteins voraussagen. Durch eine Modifikation dieses Programms, das unter Material und Methoden konkreter dargestellt wird, werden verschiedene Parameter wie Sekundärstruktur, lokale Hydrophilizität, Oberflächenwahrscheinlichkeit oder Flexibilität kombiniert. Durch dieses Verfahren lassen sich sog. Antigenitäts-Indices berechnen, die mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit antigene

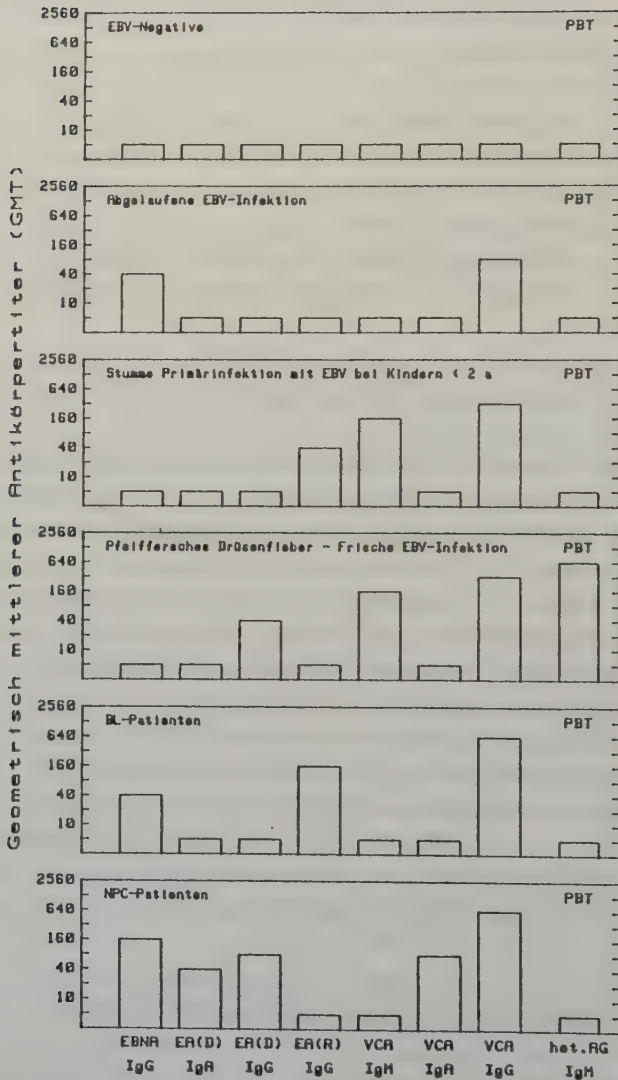


Abb. 1: EBV-spezifische Antigen-Antikörper-Muster
(nach W. HENLE et al., 1979; W. u. G. HENLE, 1982).

und damit - unter gewissen Vorbehalten - auch immunogene Regionen determinieren (WOLF et al., 1987). So wurden anhand der genannten Methoden potentielle antigene Regionen des HIV-I identifiziert. Dieses Virus gehört unter den Retroviridae zur Subfamilie der Lentivirinae, spielt bei der Ätiopathogenese von AIDS eine entscheidende Rolle und weist in morphologischer sowie genetischer Hinsicht gewisse Ähnlichkeiten zum Visna-Maedi-Virus der Schafe auf. STARCICH et al. (1986) und MODROW et al. (1987 a) stellten die Nukleotid- und AS-Sequenzen sowie Computergraphiken von 5 bzw. 7 autonomen AIDS-Virus-Isolaten dar. Um die Zuverlässigkeit der Computervorhersagen zu überprüfen, wurden sie bei einer Reihe von Proteinen, deren antigene oder immunogene Bereiche durch Testung synthetischer Peptide und Röntgenstrukturanalysen bekannt waren, eingesetzt. Es erwies sich in nahezu allen Fällen eine gute Übereinstimmung zwischen Computervoraussagen und experimentell belegten Epitopen (JAMESON u. WOLF, Manuskript in Vorbereitung).

Aufgrund des wahrscheinlichen Vorkommens von α -Helices, β -Faltblattstrukturen, Zufallswindungen und β -Turnregionen zusammen mit der Verteilung von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren lassen sich potentielle Membranproteine identifizieren und nach strengen Auswahlkriterien partiell als Oligopeptide in der Festphasensynthese herstellen. Eine andere Möglichkeit bietet die gentechnologische Produktion kleiner Abschnitte immunogener Proteinregionen in Zellsystemen, wie z.B. Bakterien, und deren Fusion zu größeren Polypeptiden; diese Methode soll gegenüber der chemischen Synthese den Vorteil einer besseren Anpassung ans native EBV-Protein haben (MOTZ, 1986).

2.2.9 Charakterisierung EBV-assoziiierter Erkrankungen

Bereits in den vorangestellten Abschnitten wurde auf die Geschichte, Morphologie und Biologie, den Infektionsmodus und die Epidemiologie sowie das Antigensystem des EBVs eingegangen. Dieser Teil beschäftigt sich nun mit der Pathogenese, Pathologie, Klinik, klinischen Diagnose und Differentialdiagnose, Therapie, Immunologie, Prognose und Prophylaxe der entsprechenden Viruserkrankungen und soll zumindest einen kurzen Überblick vermitteln.

2.2.9.1 Infektiöse Mononukleose

2.2.9.1.1 Pathogenese

Das Virus tritt in den Mundrachen ein und wird möglicherweise primär in den Epithelzellen des vorderen Oropharynx und nach Ausbreitung via Lymphozyten in den Speicheldrüsen und evtl. in der buccalen Mukosa repliziert. Nach der Primärinfektion scheiden IM-Patienten das Virus über Wochen bis Monate über den Nasen-Rachen-Raum aus. Die Infektion selbst geschieht durch die Inhalation virushaltiger Sekrettröpfchen auf aerogenem Weg. Dabei stellen Mundhöhle und Rachenring die Eintrittspforten dar. Im Gegensatz zu den Tröpfchen- sollen auch Schmutz- und Schmierinfektionen möglich sein. Zusätzlich bieten genitale Verletzungen eine weitere Gelegenheit zur viralen Invasion. HAAGEN (1974) unterscheidet 2 Infektionswege: den rein oralen per Tröpfchen- und den fäkal-oralen per Schmierinfektion.

Insbesondere kommt es im oropharyngealen Bereich zu einer B-Zell-Aktivierung und -Transformation und schließlich zu ihrer Blutzirkulation sowie Verteilung im KM und in lymphoiden Organen (MILLER, 1985). Allerdings dienen möglicherweise nur einige Epithelzellen im Nasen-Rachen als primäre Targets (LEMON et al., 1977), und die B-Lymphozyten besitzen eine limitierte Zugänglichkeit für das EBV (W. u. G. HENLE, 1982).

Deshalb beherbergt nur eine kleine Anzahl von B-Lymphozyten das Virus lebenslang, und entsprechend sorgen EBNA-positive B-Zellen, die zu 1-10% spontan den lytischen Zyklus durchlaufen, nach einer abgelaufenen EBV-Infektion für die Aufrechterhaltung eines bestimmten anti-VCA-IgG-Titers. Im Gegensatz zum späten Erscheinen von anti-EBNA treten beim anti-MA, -EA und -VCA frühe Maximaltiters auf. Es gilt als gesichert, daß einige B-Lymphozyten in vivo zu permanent wachsenden Lymphoblasten transformiert werden und z.T. für die Lymphoproliferation bei der IM verantwortlich sind (W. u. G. HENLE, 1982).

EBNA-positive lymphoide Zellen sind vorübergehend im zirkulierenden Blut während der frühen, akuten IM-Phase nachweisbar (s. 2.2.7.4; KLEIN et al., 1976), sie wurden aber auch bei fatalen Fällen in verschiedenen Organen beobachtet. Eine geringe Anzahl von ihnen repliziert das Virus spontan zu jeder Zeit und führt zur Synthese von MA, EA, VCA und Viruspartikeln, deren Freisetzung durch virusinduzierte Zellyse, Zelldegenerationen, Aktivierung von NKs oder später durch die

ADCC geschieht. Es muß aber betont werden, daß die meisten EBV-transformierten und EBNA-positiven B-Zellen nicht zum Virus-Producer werden, und andererseits EBV-tragende B-Lymphozyten im Verlauf der IM nie einer völligen Tilgung unterliegen. Sie persistieren vielmehr zu einem geringen Prozentsatz im lymphoretikulären System per vitam (W. u. G. HENLE, 1982). Auch EBV-spezifische Killerzellen werden nach der Genesung nie total eliminiert, sie bestehen jedoch in einer Menge, die mit den gegenwärtig verfügbaren Mitteln nicht beweisbar ist.

Im Rahmen der IM-Entstehung läßt sich folgender histopathologischer Befund erheben: die Lymphknoten sind ubiquitär mäßig vergrößert. Die Milz zeigt eine Hyperplasie der roten Pulpa, und oft lassen sich fokale u.v.a. subkapsuläre Hämorrhagien feststellen. Bei fatalen - aber seltenen - Fällen treten im Nervensystem eine Reihe von Alterationen auf.

Im Hinblick auf die humorale und Zell-vermittelte Immunabwehr kann während der ersten Wochen der klinischen Erkrankung eine mononukleäre Lymphozytose und Zunahme der B-Lymphozyten diagnostiziert werden (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979).

2.2.9.1.2 Pathologie

Im allgemeinen handelt es sich um eine benigne Erkrankung, bei der u.a. Lymphknoten, peripheres Blut, Milz und Leber und weniger häufig Herz, Lunge, Nieren und ZNS betroffen sind (MILLER, 1985). Letale Ausgänge sind selten und können durch eine multiple Organbeteiligung, ein hämolytisches Syndrom, eine Laryngotracheobronchitis und Bronchopneumonie sowie einen Larynxverschluß infolge einer Ödembildung bedingt sein (HAAGEN, 1974). Bei schweren Fällen werden Lymphknoten und Milz weich, fleischig und hyperämisch; evtl. treten eine Myocarditis, interstitielle Pneumonie oder Glomerulonephritis hinzu.

Generell wird das pathologisch-anatomische und -histologische Bild von Lymphdrüsenprozessen beherrscht. Die IM gilt als Systemerkrankung des RES. Die Lymphknoten-Struktur ist scheinbar durch eine starke Zellproliferation zerstört. Am pathologischen Geschehen scheint die Milzbeteiligung entscheidend zu sein. Durch eine Vergrößerung und Erweichung der Milz kann eine Zersetzung von Kapsel und Balken entstehen. In seltenen Fällen kommt es zu Veränderungen im KM.

Bereits PFEIFFER (1889) beschrieb die Leberbeteiligung am Krankheitsgeschehen, für das eine klinische, hämatologische und serologische Trias charakteristisch ist. Bei den Leberparenchymzellen mani-

festtieren sich Veränderungen mit einem Höhepunkt am 10.-30. Krankheitstag. Es besteht jedoch keine Tendenz zur Zirrhose. In 90% der IM-Seren ist die GPT erhöht.

Herdförmige interstitielle Infiltrationen abnormer Lymphozyten vermögen im Myokard gelegentlich eine Myocarditis zu provozieren. Dabei kann durch den Zerfall von Herzmuskelfasern die Gefahr einer Lungenembolie bestehen. Außerdem ermöglicht zu Beginn der Gravidität die IM-Erkrankung der Mutter eine Embryopathie, als deren Folge kongenitale Herzvitien und Katarakte beobachtet wurden.

Schließlich werden vereinzelt ausgedehnte enzephalitische Prozesse und Veränderungen im Nervensystem angetroffen (HAAGEN, 1974).

2.2.9.1.3 Klinik

Unspezifische Symptome, die einer oberen respiratorischen Infektion gleichen, kennzeichnen das Krankheitsbild der IM. Vor allem tritt es beim älteren Kind, Jugendlichen und jungen Erwachsenen auf. Kopfschmerz, Übelkeit und Müdigkeit begleiten ein Prodromalstadium von 3-5 Tagen. In der 1. Krankheitswoche beklagen über 80% der Patienten einen rauhen Hals. Es besteht eine Hyperämie und Hyperplasie des lymphoiden Gewebes im Oropharynx. Am weichen Gaumen zeichnen sich Tonsillenbeläge und Petechien ab. Über 30% der Halskulturen sind hinsichtlich hämolyzierender Streptokokken positiv. Ein Fieber mit Temperaturanstiegen bis $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ dauert ca. 10 d und fällt dann stufenweise über weitere 7-10 d ab.

IM-Patienten entwickeln allmählich eine generalisierte Lymphadenopathie. Eine Milzruptur stellt eine seltene, aber überaus ernsthafte Komplikation dar (DÖHRMANN u. SCHEELE, 1986). Bei $> 10\%$ der Erkrankten findet sich eine Hepatosplenomegalie, und einige Patienten zeigen ein Hepatitis-ähnliches Syndrom. Die Mehrheit besitzt im Serum einen erhöhten Transaminase- und LDH-Titer, die über Wochen bis Monate nach der Erkrankung bestehen bleiben. In ungefähr 5% der Fälle zeigen sich Exantheme. Eine Pneumonitis und selten ein Pleuraerguß können die IM begleiten.

Einige ZNS-Syndrome wie aseptische Meningitis, Enzephalitis, akute Psychose, Koma, Myelitis, akutes zerebellares Syndrom und infektiöse Polyneuritis wurden beschrieben.

Bei den festen Blutbestandteilen werden eine Reihe von Abweichungen vorgefunden: dazu zählen eine Thrombozytopenie, eine Neutropenie und

eine hämolytische Anämie. Diese Syndrome können eine Folge der AK-Synthese gegen normale Blutbestandteile sein.

Fatale Auswirkungen ereignen sich i.d.R. bei Personen, die einem Immundefekt unterliegen. Die verhängnisvollen Formen lassen sich in 2 Typen aufgliedern: beim proliferativen Verlauf ereignet sich gemäß der Organinfiltration mit EBV-infizierten B-Zellen ein progressives Versagen von Lunge, Niere, Leber und KM. Beim aproliferativen Phänotyp sterben die Patienten an einer überschießenden Infektion oder Hämorrhagie, die möglicherweise aus einer abnormen Immunregulation resultieren (MILLER, 1985).

Tabellarisch faßten SCHOOLEY u. DOLIN (1979) die Symptome der IM nach fallender Tendenz zusammen.

Symptome	$\bar{m}$ (in %)	Bereich (in %)
Rauher Hals	82	70-88
Unwohlsein	57	43-76
Kopfschmerz	51	37-55
Anorexie	21	10-27
Myalgie	20	12-22
Schüttelfrost	16	9-18
Nausea	12	2-17
Abdominale Beschwerden	9	2-14
Husten	5	5
Erbrechen	5	5
Arthralgie	2	2

Tab. 4: Symptome der IM (nach SCHOOLEY u. DOLIN, 1979).

2.2.9.1.4 Klinische Diagnose

In der Diagnostik ergänzen sich die Beurteilung des klinischen Status und der labortechnischen Untersuchungen.

Für die IM ist eine Trias von Fieber, Vergrößerung und Verhärtung der Milz und Leber sowie einer allgemeinen Schwellung des lymphatischen Systems charakteristisch. Petechiale Blutungen in der Mundschleimhaut (v.a. am Rachendach) und Gaumenpetechien sind bezeichnend. Ein palatales Enanthem und ein supraokuläres Ödem mit Ptosis sollen für die IM nahezu pathognomonisch sein. Allgemein sind auch Müdigkeit,

Anorexie, hepatolienale Sensibilität und eine Verlegung der Gallenwege durch vergrößerte benachbarte Lymphknoten diagnostisch verwertbar.

Labordiagnostisch wurde bereits auf die serologische Bedeutung eingegangen (s. 2.2.7). Im Differentialblutbild ergibt sich eine Zunahme an Monozyten und Lymphozyten auf Kosten neutrophiler Granulozyten. Daher besteht eine absolute und relative Monozytose, die auf der Höhe der Erkrankung bis 90% und mehr ausmachen kann. Generell wird der Anteil monozytoider Zellen auf 30% der Gesamtleukozyten geschätzt, die i.d.R. vermehrt sind. Als Ursache für die Lymphozytose wird eine Erschöpfung der Nebennierenrinde aufgrund einer gesteigerten Aktivität der Hypophyse in der Streßperiode angegeben. Im Normalfall bleibt das rote Blutbild unverändert. Durch das mögliche Abwandern von Eisen ins RES kann es jedoch zur Hämoglobinabnahme und letztlich zur Anämie kommen. Thrombozytopenien sind üblich (50% der Patienten haben weniger als 140.000 Blutplättchen/ μ l). Durch die beschleunigte BSG lassen sich M. Hodgkin und Leukämie gegen die IM abgrenzen (HAAGEN, 1974).

2.2.9.1.5 Differentialdiagnose

Die Möglichkeit eines anginösen Verlaufs der IM erfordert eine differentialdiagnostische Abgrenzung. Dabei sind folgende Krankheitsbilder zu berücksichtigen: Diphtherie, Tonsillitis, lymphatische Leukämie, infektiöse Lymphozytose, Lymphogranulomatose (M. Hodgkin), Geschwülste, Drüsentuberkulose, Brucellose, Masern, Scharlach, Röteln, Typhus abdominalis, Tularämie, Influenza, Erkältungen, Toxoplasmose, Lues, Leptospirose und Lymphadenitis im Anschluß an eine Kokkeninfektion des Mund-, Nasen- und Rachenraumes. Mit Hilfe des PBTs sollen Listeriose, Rickettsiose und Toxoplasmose auszuschließen sein (HAAGEN, 1974). Eine virale Hepatitis kann infolge der deutlichen Zunahme hepatozellulärer Enzyme von der IM unterschieden werden (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979).

2.2.9.1.6 Therapie

Im wesentlichen geschieht sie symptomatisch und unterstützend, denn > 95% der Patienten erholen sich ohne eine spezifische Therapie problemlos (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979). Bis zur Normalisierung des subjektiven Krankheitsgefühles ist Bettruhe angezeigt. V.a. bei Splenomegalien ist ein schweres Heben und jegliche Form der vorzeitigen körperlichen Anstrengung in den ersten 2-3 Wochen zu vermeiden. Dieser Zeit-

raum gilt auch in etwa für die erneute Arbeitsaufnahme (HAAGEN, 1974).

Im Rahmen der antiviralen Chemotherapie ließ sich bisher keine dramatische klinische Wirkung erzielen (MILLER, 1985). Allerdings soll humanes α -Interferon die Stimulation der zellulären DNA-Synthese und nach einer Inokulation frischer Lymphozyten mit EBV die Zellentwicklung behindern. Durch Virostatika (CG 662) und das anti-Herpes-Therapeutikum Aciclovir sollen die wichtigsten IM-Symptome günstig beeinflußt werden und die Fieberphase, Rachenbeschwerden und Milzschwellung rascher abklingen (HAAGEN, 1974). Eine Tonsillektomie wird in manchen Kliniken zur Milderung schwerer Verlaufsformen der IM durchgeführt (WOLF, persönliche Mitteilung).

2.2.9.1.7 Immunologie

Nach einer Primärinfektion besteht auch beim stummen oder subklinischen Verlauf eine dauernde Immunität. Durch die mögliche diaplazentare Übertragung von EBV-AKs besteht in den ersten 4 Lebensmonaten für den Säugling eine passive Immunität, die auch als maternale Leihimmunität bezeichnet werden kann (HAAGEN, 1974).

2.2.9.1.8 Prognose

Sie ist im allgemeinen als gut zu bezeichnen, obwohl offensichtlich eine Wandlung der IM zu größeren Schweregraden stattfindet. Nach der Genesung bleiben keine Schädigungen des lymphatischen Apparats zurück. Auch die im EKG diagnostizierten Herzscheidigungen bilden sich zurück. Die Prognose der Hepatitis mononucleosa ist i.d.R. ebenfalls gut. Die meningitischen und enzephalitischen Formen verlaufen trotz heftiger Initialsymptome meist günstig. In 85 % neurologischer Anzeichen kann eine Heilung erreicht werden.

Durch anhaltende Leber- und ZNS-Schäden, v.a. aber Muskelschwäche der Beine und des Gesichts, kann die Rekonvaleszenz einige Wochen dauern. Kinder erholen sich im Normalfall stets schneller als Erwachsene.

Todesursachen sind selten und werden in abnehmender Reihenfolge ihrer Häufigkeit folgendermaßen angegeben: Milzruptur, aufsteigende Lähmung bei Meningo-Enzephalomyelitis, Pneumonie, Sepsis und lokale Eiterungen, Glottisödem, massive Nasopharyngealblutung, Myocarditis und Verblutung bei hämorrhagischer Diathese (HAAGEN, 1974).

2.2.9.1.9 Prophylaxe

Da die EBV-Ausbreitung einen "intimen" Kontakt verlangt, ist bei sporadischen Fällen keine Isolierung erforderlich. Sie ist aber bei epidemischen Ausbrüchen wegen der dann bestehenden Kontagiosität zu empfehlen (HAAGEN, 1974).

Durch Schafs-Erythrozyten lassen sich heterophile AK zwar erhöhen, sie sind jedoch weder persistent noch protektiv. Einerseits könnte die Möglichkeit zur Herstellung einer inaktivierten Vakzine bestehen, andererseits verlangt die onkogene Potenz von EBV dieses Risiko bei jeglichen Vakzinen sorgfältig zu berücksichtigen. Die Reinigung von individuellen EBV-Polypeptiden vermag derartige Gefahren zu reduzieren oder zu eliminieren. Über die Immunogenität solcher Polypeptide sowie ihre AK, die gegen diese Untereinheiten gerichtet sind, wären weitere Informationen erforderlich (SCHOOLEY u. DOLIN, 1979).

Bisher wurden noch keine Impfstoffe gegen das EBV entwickelt. Allerdings wird an der Entwicklung einer Subunitvakzine aus einer oder mehreren MA-Komponenten mit bekannter Induktionspotenz für virusneutralisierende AK gearbeitet. Ein anderer Antigenkandidat für eine EBV-Vakzine ist das LYDMA, welches eine zellvermittelte Immunität induziert (s. 2.2.7.5; MILLER, 1985).

Möglichkeiten einer EBV-Immunisierung mittels synthetisch oder gentechnologisch hergestellter Peptide (Antigene) werden noch weiter unten zu diskutieren sein.

2.2.9.2 Burkitt-Lymphom

2.2.9.2.1 Pathogenese

Das BL tritt einige Jahre nach der Primärinfektion mit EBV auf. Im Gegensatz zur IM oder einigen Lymphomen immunschwacher Personen ist das BL eine monoklonale Erkrankung. BLs weisen regelmäßig bei solchen Chromosomen, die Ig-Gene enthalten, Anomalien auf. Die meist bekannte Abnormität, die in $> 90 \%$ gesehen wird, ist eine Translokation zum langen Schenkel des Chromosoms Nr. 14. Weniger häufig werden Translokationen zu den Chromosomen Nr. 2 oder 22 gesehen. Der Spender des translozierten Stückes ist eine distale Region des Chromosoms Nr. 8. Gewöhnlich ereignet sich eine reziproke Translokation vom Chromosom

Nr. 14 zu 8, 22 zu 8 oder 2 zu 8. Diese chromosomalen Anomalien sind weder in peripheren Lymphozyten noch in lymphoblastoiden Zelllinien von BL-Patienten anzutreffen. Daher entsteht die Translokation am wahrscheinlichsten durch die EBV-Transformation oder einen anderen Initiator. Es spricht wenig dafür, daß BL-Patienten im Normalfall immunschwach sind (MILLER, 1985).

2.2.9.2.2 Pathologie

Gewöhnlich ist das BL zur Zeit der Diagnose bereits multifokal, obwohl der Tumor bei seiner initialen Entdeckung oft in Kiefernähe liegt. In charakteristischer Weise bezieht das Malignom die Niere, Leber und das lymphoide Gewebe des Darmes mit ein. Es scheint auch endokrine und exokrine Drüsen wie Schild- und Speicheldrüse, Nebennieren, Eierstöcke und Hoden zu bevorzugen. Weniger häufig sind periphere Lymphknoten, Lunge oder lymphoides Gewebe des Nasopharynx betroffen.

In morphologischer Hinsicht wird der Tumor als ein schwach differenziertes, diffuses Lymphom eingestuft. Der vorherrschende Zelltyp scheint eine primitive Stammzelle oder ein Lymphoblast zu sein. Die Tumorzellen sind mit Histiozyten oder Makrophagen durchsetzt, die dem BL ein "Sternenbild" verleihen, allerdings ist dieses Aussehen nicht einheitlich vorzufinden. Es wird auch in anderen schnell wachsenden Lymphomen beobachtet. BLs zeigen vermutlich infolge der raschen Progression große Nekroseherde, und der Zelltod scheint für die histiozytäre Infiltration verantwortlich zu sein. Vermutlich entsteht der Tumor im trabekulären Mark des Unterkiefers, obwohl dies noch nicht verbindlich festgestellt werden konnte. I.d.R. ist das distale KM nicht betroffen, und eine leukämische Transformation ist kein gewöhnliches Merkmal des BLs (MILLER, 1985).

2.2.9.2.3 Klinik

Bei $\geq 60\%$ der Kinder zeigt sich das BL als eine unilaterale Kieferschwellung. Für jüngere Kinder sind Kieferschwellungen, für ältere dagegen abdominale Neoplasien typisch.

Kiefertumoren werden bei BLs außerhalb der endemischen Gebiete Afrikas weniger häufig gesehen. Nur selten präsentiert sich das Malignom als eine Hepatosplenomegalie oder Vergrößerung der peripheren Lymphknoten. Ein leukämischer Befall des KMs gilt ebenfalls als ein

seltenes initiales Merkmal. Gelegentlich kann der Tumor aufgrund der Symptome des befallenen ZNS' wie etwa einer Paraplegie, einer Gehirnnerven-Paralyse oder meningealen Irritation entdeckt werden.

Da das BL rasch wächst, ist sein klinischer Verlauf gewöhnlich kurz. Einige Symptome resultieren aus der schnellen Tumorzunahme, dem Abbau und der Freisetzung intrazellulärer Metaboliten. So beinhalten Komplikationen eine Azothämie, Hyperurikämie, Hyperkaliämie und Laktatazidose (MILLER, 1985).

2.2.9.2.4 Klinische Diagnose

Auf die Relevanz der AG-AK-Diagnostik wurde bereits eingegangen (s. 2.2.7). Sie liegt in den Hochrisikogebieten bei einem imponierenden und für das BL typischen klinischen Zustand besonders nahe.

Im pathologischen Material läßt sich EBV mittels NS-Hybridisierung nachweisen. Die Proben werden gegenwärtig mit ^{32}P markiert, obwohl in naher Zukunft eine NS-Hybridisierung mit nicht radioaktiv markierter DNA verfügbar sein wird. Mit dieser Methode vermag man EBV-DNA in BLs, NPCs und polyklonalen Lymphomen nachzuweisen (MILLER, 1985).

Außerdem lassen sich BL-Linien relativ leicht in Kultursuspensionen von fein verteiltem BL-Tumorgewebe etablieren (EPSTEIN et al., 1964).

2.2.9.2.5 Differentialdiagnose

Maligne lymphoproliferative Syndrome und solche, die mit einer hämolytischen Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie verknüpft sind, werden leicht mit einer akuten Leukämie verwechselt. Falls eine Lungenentzündung der Hauptbefund sein sollte, muß eine große Anzahl ätiologischer Faktoren in Betracht gezogen werden.

Das BL muß gegen andere lymphoretikuläre Malignitäten abgegrenzt werden. Dies geschieht normalerweise auf histologischer Basis und durch den Einsatz verschiedener Marker für lymphozytäre Subpopulationen (MILLER, 1985).

2.2.9.2.6 Therapie

Gewöhnlich ist das BL zur Zeit der Diagnose bereits multifokal. Daher gilt die systemische Chemotherapie als der primäre Weg. Die Chirurgie und Radiotherapie werden als Hilfsmittel zur Reduktion der Tumormasse

eingesetzt. Der Tumor ist gegen zytotoxische Agenzien, die im Regelfall zyklisch eingesetzt werden, einigermaßen empfindlich. Oft genügen 6 Einzeldosen von Cyclophosphamid (40 mg/kg KGW) im Abstand von 2-3 Wochen, wobei die Regeneration der peripheren Granulozyten auf mindestens 1.500/ μ l gewährleistet sein sollte. Viele Behandlungsprotokolle beinhalten zur Induktion der Remission andere Stoffe wie z.B. Vincristin und Methotrexat. In ca. 80-90 % der Fälle kann bei Patienten mit dem afrikanischen BL-Typ eine Remission erreicht werden.

Eine bedeutende Therapie-Komplikation, die v.a. in der 1. Woche bei Patienten mit einer großen Tumormasse auftritt, ist das sog. "akute Tumorlysis-Syndrom". Es ist die Folge eines schnellen Abbaus und Todes der Tumorzellen. Die Patienten entwickeln eine metabolische Azidose, Hyperurikämie, Hyperphosphaturie, Hyperproteinämie und Hyperkaliämie. Solche Personen können plötzlich an einer kardialen Arrhythmie versterben, andere können ein akutes Nierenversagen entwickeln, das wahrscheinlich als Sekundärfolge einer urämischen Nephropathie zu betrachten ist. Daher wird vor und während der Chemotherapie Allopurinol als Antidot empfohlen (MILLER, 1985).

2.2.9.2.7 Immunologie

Hierzu wurden wichtige Aspekte bereits unter 2.2.6 und 2.2.7 erwähnt. Permanent hohe AK-Titer gegen spezifische EBV-Antigene belegen ein hoch aktives Virusträger-Stadium, das zur BL-Induktion prädisponieren kann; dieser Schluß folgt auch aus einer prospektiven Studie in Uganda. Weniger als 3 % der afrikanischen BL-Fälle sind nicht EBV-assoziiert. Diese Patienten zeigen im Vergleich zu jenen in Amerika oder Europa eine höhere Altersstufe einschließlich junger Erwachsener. Hinsichtlich der Inzidenz der Altersspitze, der Organmanifestation und der wirksamen Therapie konnten zwischen afrikanischen und amerikanischen BLs Unterschiede festgestellt werden (W. u. G. HENLE, 1982).

2.2.9.2.8 Prognose

NKRUMAH et al. (1976) verwiesen darauf, daß die Höhe der anti-VCA- und anti-EA(R)-Titer mit den Gesamtbeschwerden des BLs zusammenhängt und die AK-Muster bis zu einem gewissen Ausmaß die Prognose belegen. Dabei soll v.a. der anti-EA(R)-Titer für die Vorhersage des weiteren Verlaufs entscheidend sein. Die anti-MA-Titer könnten bei der therapeu-

tischen Verlaufskontrolle eine Rolle spielen (W. u. G. HENLE, 1982). Obwohl das BL unter einer geeigneten Chemotherapie (Zytostatika) meist rasch zur Regression kommt, treten oft nach mehreren Jahren Rezidive auf, die häufig gegen jegliche Therapieform resistent sind und dann letal enden. Zum anderen ist eine vollständige Tumorrückbildung nicht ausgeschlossen (PSCHYREMBEL, 1986). Trotz der meist ansprechenden Behandlung, aber im Hinblick auf ein nicht auszuschließendes Rezidiv, kann daher auch beim erstmaligen Auftreten des BLs die Prognose lediglich ungewiß bis zweifelhaft sein. Dagegen muß sie überwiegend als infaust bezeichnet werden, falls mehrere Jahre nach der Primärerkrankung ein Rückfall erfolgt.

2.2.9.2.9 Prophylaxe

Die Vakzination gegen das BL, das mehrere Jahre nach der Primärinfektion mit EBV auftreten kann und in unterentwickelten Teilen der Welt vorkommt, stellt im Hinblick auf die epidemiologische Überwachung gewaltige Probleme dar. Es kann angenommen werden, daß eine Malaria-Kontrolle mit einem Rückgang der BL-Inzidenz verbunden ist; dies bewiesen jedenfalls Malaria-Bekämpfungsmaßnahmen in endemischen Gebieten. Ferner scheint ein abnehmendes BL-Vorkommen in Uganda, Natal und Neuguinea zur gleichen Zeit aufgetreten zu sein, zu der auch die Malaria-Bekämpfungsprogramme zunahmen (MILLER, 1985).

2.2.9.3 Nasopharynx-Karzinom

2.2.9.3.1 Pathogenese

Für den Befall der Epithelzellen des Nasopharynx durch EBV wurden verschiedene Hypothesen entwickelt. Einmal könnten spezifische Zellen existieren, die EBV-Rezeptoren besitzen. Eine weitere Möglichkeit wäre das Vorkommen bestimmter Virusvarianten, die die Epithelzellen zu penetrieren vermögen. Schließlich wäre durch eine Fusion mit infizierten Lymphozyten, die das virale Genom tragen, eine EBV-Übertragung auf die Epithelzellen denkbar.

Zweifellos spielen genetische Faktoren bei der Pathogenese eine Rolle, da das NPC-Vorkommen bei Personen mit südchinesischer Abstammung bedeutend höher als erwartet liegt (MILLER, 1985). Auch ABRESCH

und HORNING (1986) verweisen auf genetische Dispositionen und regional vorkommende Kokarzinogene, die unter der Voraussetzung persistierender EBV-Antigene - oft über 5 Dezennien hinweg - zur NPC-Entwicklung beitragen sollen.

2.2.9.3.2 Pathologie

Diese Tumoren nehmen im Epithel des Nasopharynx ihren Ausgang. Anaplastische oder schwach differenzierte Formen sind mit EBV-Genomen assoziiert. Die NPCs gelten als aggressiv und metastasieren entlang den lokalen Lymphgefäßen zu regionalen Lymphknoten. Daher präsentiert sich das Malignom oft als ein vergrößerter Hals-Lymphknoten in Verbindung mit Metastasen (MILLER, 1985). In einigen Fällen drang der Tumor, als dessen primärer Lokalisationsort der postnasale Raum gilt, ohne signifikanten Hals-Lymphknoten-Befall durch seine direkte Ausdehnung vom Nasenrachen aus ins ZNS ein (W. u. G. HENLE, 1982).

Zum einen kann das NPC über verschiedene Organe und Gefäßsysteme (Lunge, Leber, paravertebrale Venengeflechte, Hohlvene und Pfortader) metastasieren, zum andern ist eine lymphogene Ausbreitung möglich. Skelett- scheinen gegenüber Lungenmetastasen zu überwiegen (KARSTENS et al., 1984). Insgesamt wird eine Fernmetastasierungsrate von ca. 30% veranschlagt, die aber bei Hochrisikogruppen > 50% zu liegen scheint (MERTENS et al., 1984).

Unter histologischem Aspekt ist die starke Lymphozyteninfiltration des Tumors auffällig (MILLER, 1985). Bei der Klassifizierung überwiegen die plattenepithelialen Karzinome (ca. 50%) gegenüber den lymphoepithelialen (ca. 12,5 %; ZIEGLER et al., 1984 a). Diesbezüglich geben andere Autoren 41 % respektive 30 % an (ZIEGLER et al., 1984 b).

Durch seine Expansions Tendenz kann das NPC den retrobulbären Raum, das Ethmoid und Sphenoid, den Epipharynx und Maxillasinus und schließlich diverse Areale des Gehirns erfassen (TREUNER et al., 1980).

2.2.9.3.3 Klinik

Die Symptomatik hängt von der Lokalisation des Primärtumors innerhalb des Nasopharynx ab. In > 50 % finden sich Halsschwellungen gemäß der Ausbreitung auf die regionalen Lymphknoten. Ein postnasaler Ausfluß, eine Epistaxis und Verlegung der Eustachischen Röhre sind weitere Anzeichen. Als Folge können eine Verschlechterung des Gehörs, ein Ohren-

sausen (Tinnitus) und eine Otitis media auftreten. Durch eine lokale Ausdehnung vermögen sich Läsionen der Kopfnerven, Kopfschmerzen und bei befallenen Kaumuskeln Trismen zu manifestieren. Gelegentlich resultieren Initialsymptome aus einer Verlegung der paranasalen Sinus' Das NPC kann ins Skelett (v.a. in die Wirbelsäule), in die Leber, Lunge, Haut und peripheren Lymphknoten metastasieren (MILLER, 1985).

Eine Behinderung der Nasenatmung, das Auftreten von Schluckbeschwerden, Visusminderungen bis hin zu totalen -verlusten und Doppelbilder sind weitere Möglichkeiten und verdeutlichen das dramatische Expansionsrisiko dieses Tumors (KUTZNER et al., 1984).

2.2.9.3.4 Klinische Diagnose

Ungeachtet der serologischen Feststellung (s. 2.2.7) beruht die NPC-Diagnose auch auf der pathohistologischen Untersuchung von bioptischem Material. Sie kann mit anderen squamösen Neubildungen (Neoplasmen) des Kopfes und Halses verwechselt werden (MILLER, 1985). Im Hinblick auf die Therapie und Prognose ist die Klassifizierung nach TNM-Stadien oder die histologische Einstufung nach dem Kölner Schema (KRÜGER u. WUSTROW, 1981) wertvoll. Der Nachweis von EBV-DNA oder EBNA-positiven Karzinomzellen in Lymphknoten-Biopsien ist ebenfalls ein wichtiges Indiz für die klinische Diagnostik.

2.2.9.3.5 Differentialdiagnose

Nach einer Untersuchung von KRÜGER und BERTRAM (1984) überwiegen bei den NPCs die nichtverhornenden oder undifferenzierten gegenüber den verhornenden Plattenepithelkarzinomen bei weitem. In einem Drittel der Fälle soll die Erstdiagnose an Hals-Lymphknoten-Metastasen gestellt werden, die klinisch imponieren (KRÜGER et al., 1981). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer kritischen Differentialdiagnose durch den Pathologen. Die NPC-Diagnose mußte in 11,8 % nach weiteren zytochemischen und immunologischen Methoden korrigiert werden. Insbesondere müssen maligne Lymphome und anaplastische Karzinome bei unbekanntem Primärtumor abgegrenzt werden.

Durch die T- und B-Zellbestimmung lassen sich in der Pathohistologie maligne Lymphome ausschließen. Die Abgrenzung myeloproliferativer Erkrankungen kann mit Chloracetatesterase und Peroxidase histologisch vorgenommen werden. Die epitheliale Natur einer Neoplasie und ihre

pathogenetische Beziehung zur EBV-Infektion läßt sich durch die IF oder Immunperoxidase-Reaktion auf Keratin und EBNA belegen (KRÜGER u. BERTRAM, 1984).

2.2.9.3.6 Therapie

Das NPC wird chirurgisch in Kombination mit einer lokalen, hochdosierten RT angegangen. Der Therapieerfolg und die Überlebenschance hängen vom Krankheitsstadium z.Zt. der Diagnosestellung ab. Beim Stadium I beträgt die 5-Jahres-ÜLZ ca. 80 %. Hat sich dagegen die Erkrankung entlang der Hals-Lymphknoten zu der supraklavikulären Grube ausgebreitet (Stadium IV), so treten rasch Fernmetastasen auf und die 5-Jahres-ÜLZ liegt dann unter 20 % (MILLER, 1985).

Infolge der hohen Fernmetastasierungsrate empfehlen KARSTENS et al. (1984) eine adjuvante Chemotherapie. Sie diskutieren die Ansprechraten verschiedener Zytostatika bei einer Monotherapie. Mit einem Behandlungsregime von ABVD (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbacin) haben sie beim NPC mit Fernmetastasen komplette und partielle Remissionen beobachtet, die allerdings zeitlich mehr oder weniger limitiert waren. Eine Verbesserung der rezidivfreien ÜLZ durch eine kombinierte radiologische und zytostatische Therapie konnte noch nicht bewiesen werden. Diese Arbeitsgruppe vertritt die Auffassung, daß wegen der Virusätiologie des NPCs und der schlechten Ansprechraten einer Polychemotherapie eine Interferontherapie zu vertreten sei und weitere Untersuchungen bezüglich einer kombinierten Chemo- und Interferontherapie zu erfolgen hätten.

ABRESCH und HORNING (1986) schlagen vor, zuerst die Masse des Primärtumors soweit als möglich chirurgisch zu reduzieren (z.B. Hals-Lymphknoten-Exstirpation), dann Radiotherapie anzuschließen und ggf. noch Chemotherapie folgen zu lassen, obwohl bei Lymphknoten- und Fernmetastasen bisher eine geringe Überlebenschance besteht (ÜLZ von 6-36 Monaten). Als ultima ratio wird von ihnen eine adjuvante Interferontherapie vorgeschlagen, die jedoch bei einer großen Tumormasse das Wachstum keineswegs zu hemmen vermag.

Als β -Interferon wurde das Fiblaferon^R 1983 vom BGA auch zum Einsatz in der Onkologie zugelassen (RENTSCHLER GmbH & Co., 1986). Obwohl ihm eine antivirale, antiproliferative und immunmodulierende Wirkung zugesprochen wird, konnte bis heute in der Tumorbehandlung kein sicheres Urteil über die Effektivität einer adjuvanten Interferontherapie

gefällt werden (TREUNER u. NIETHAMMER, 1984). Dieser Meinung schließen sich MERTENS et al. (1984) an, wenn auch ihre Ergebnisse einen positiven Trend für die adjuvante Interferontherapie zeigten; denn regelmäßige serologische Kontrollen im 1-2monatigen Abstand ergaben bei Patienten, die sich unter einer Interferontherapie befanden, einen sukzessiven Abfall der anti-VCA-IgA- und -IgG-Titer. PLIENINGER (1986) bezeichnet die NPC-Therapie als Domäne der RT und betont, mit dem Aufkommen neuer Behandlungsmöglichkeiten (hier β -Interferon) nicht ohne weiteres erfolgreiche Therapieschemata zu verlassen, sondern sie vielmehr in bereits bewährte Regime einzubauen. TREUNER et al. (1980) berichteten von einem NPC-Fall, der mit den herkömmlichen Therapiemethoden aussichtslos verlief und schließlich durch die alleinige β -Interferontherapie zur kompletten Remission gebracht werden konnte.

Da eine Behandlung des NPCs zumeist erst nach verspäteter Diagnose erfolgen kann, ist wegen regionaler Lymphknoten-Metastasen eine radikale Operation bei den meisten Patienten nicht mehr möglich. Schon deshalb gilt die RT nach dem chirurgischen Eingriff oder bei ausschließlicher Anwendung als die z.Zt. wirksamste Therapieform bei fortgeschrittenen Stadien (ALBERTI et al., 1984). ZIEGLER et al. (1984 b) verweisen bei der Bestrahlung auf eine hinreichend hohe Dosierung im Primärtumorbereich und eine engmaschige Nachsorge in den ersten beiden Jahren der medizinischen Intervention.

Bei fortgeschrittenen und rezidivierenden NPCs stellten DIETZ et al. (1984) durch die Kombination von RT und Chemotherapie eine Effektivitätssteigerung fest. Dagegen konnten ROSSI et al. (1985) bei der Verbindung einer Polychemotherapie (Vincristin, Cyclophosphamid, Adriamycin) mit einer RT gegenüber einer bloßen radiologischen Behandlung keinerlei positive Auswirkungen hinsichtlich einer rezidivfreien oder gesamten ÜLZ bestätigen.

Obwohl die RT beim NPC wesentliche Erfolge aufzeigen kann, stellt bei lokal austherapierten, rezidivierenden oder metastasierenden Neoplasien die Zytostatikakombination mit ihren diversen Regimen das Mittel der Wahl dar. Durch sie konnten in diesen fortgeschrittenen Fällen Remissionsraten von 67 % erzielt werden (BODEMANN, 1984).

2.2.9.3.7 Immunologie

In Gebieten mit hoher (Südchina) oder niedriger (Europa, Amerika) NPC-Inzidenz wurde EBV-DNA in undifferenzierten oder schwach differenzier-

ten Karzinomen vorgefunden (zur HAUSEN et al., 1970). Gut differenzierte NPCs erwiesen sich dagegen als nicht EBV-assoziiert (W. u. G. HENLE, 1982). Nach COATES et al. (1978) ist der postnasale Raum als primärer Sitz dieses Tumors zu betrachten. In seinen Zellen ist das gesamte EBV-Genom vorzufinden. Mit dem Fortschreiten des NPCs vom Stadium I-IV steigen die anti-VCA-IgA-, anti-EA(D)-IgA- und anti-EA(D)-IgG-Titer an und bewirken schließlich eine 4-10fache Zunahme des GMTs. Die meisten Fälle werden (leider) erst im Stadium II-IV entdeckt.

Bei der Verlaufskontrolle nach einer radiologischen oder anderen Therapieform ist in der EBV-spezifischen Serologie (s. 2.2.7) die Beobachtung des AK-Spektrums besonders nützlich. Seine Verbreiterung oder die Titerzunahme sollte zur intensivierten Suche nach Lokalisationen für Tumorrezidive veranlassen (W. u. G. HENLE, 1982). Auf die diagnostische Bedeutung NPC-spezifischer AK-Muster wurde bereits eingegangen (s. 2.2.7).

2.2.9.3.8 Prognose

Im Vergleich zu anderen Kopf-Hals-Karzinomen bezeichnet BODEMANN (1984) wegen der hohen Metastasierungsrate die Prognose des NPCs als ungünstig. Sie ist in großem Maß von der histologischen Klassifikation abhängig und muß bisher bei einer 5-Jahres-ÜLZ von insgesamt ca. 35 % als schlecht betrachtet werden (BÖTTCHER et al., 1984). Ganz allgemein hängt die prognostische Einstufung vom Tumorstadium z.Zt. der Diagnose ab. In diese Klassifizierung fließen Ausmaß und Größe des Primärtumors, sein Expansionsverhalten und Lymphknotenbefall sowie die Bildung von Fernmetastasen mit ein (ALBERTI et al., 1984; MERTENS et al., 1984).

Vergleicht man die Anzahl der NPC-Patienten in den verschiedenen TNM-Stadien zur Zeit der Erstdiagnose und ihre entsprechende 5-Jahres-ÜLZ (s. Tab. 3), so wird die Bedeutung der Frühdiagnose für die weitere Lebensdauer nochmals eklatant.

DÜHMKE et al. (1984) stellen die Prognose in Abhängigkeit von den Resultaten einer eingeleiteten RT dar. Sie errechneten für das Stadium I-III nach Therapieabschluß eine rezidivfreie 4-Jahres-ÜLZ von 63 %, denen im Stadium IV bei einer rezidivfreien 2-Jahres-ÜLZ nur 38 % gegenüberstanden. Bei einer klinisch kompletten Remission aller Tumormassen mittels RT beobachteten sie mit ihrem Patientengut eine 7-Jahres-ÜLZ von 34 % nach der Diagnosestellung.

2.2.9.3.9 Prophylaxe

In China mit einer hohen NPC-Inzidenz wurden serologische Massenkontrollen nach anti-VCA-IgA vorgenommen. Dabei lag das Vorkommen von IgA-AKs unter 150.000 getesteten Personen bei ca. 1 % (G. u. W. HENLE, 1976). Über 20 % von dieser Gruppe mit erhöhten anti-VCA-IgA-Titern, die biopsiert wurden, waren Tumorträger (MILLER, 1985). Diese Ergebnisse unterstreichen nicht nur die Relevanz der Früherkennung, sondern auch der vorbeugenden Maßnahmen bei entsprechend erhöhten Serumtitern.

Obwohl die meisten NPC-Patienten in den kommenden 50 Jahren schon jetzt mit EBV infiziert sind und am besten durch eine kontinuierliche Überwachung EBV-korrelierter AK geschützt werden können, bleibt die frühe Diagnose von immenser Bedeutung (WOLF et al., 1986). In diesem Zusammenhang könnten zu Bevölkerungskontrollen in Hochrisikogebieten Antigensets, die in E. coli exprimiert wurden, ihren Beitrag leisten (MOTZ, 1986; MOTZ et al., 1986 b).

2.2.9.4 Lymphome bei Immundefizienz

2.2.9.4.1 Pathogenese

Einige Merkmale unterscheiden diese Lymphome von den klassischen BLs. Insbesondere bei Patienten mit einer kongenitalen Immunschwäche treten diese Tumoren nach der viralen Primärinfektion auf. In den meisten Fällen sind sie polyklonal und zeigen nicht die charakteristischen Chromosomenanomalien der BLs. Beim radiologisch bedingten lymphoproliferativen Syndrom scheint ein Mangel an NKs, Interferon-vermittelter Zytotoxizität, EBV-spezifischen T-Killerzellen und einer AK-Synthese gegen EBV-Antigene vorzuliegen. Das Wesen der Immunschwäche, die für die Lymphoproliferation bei Transplantationspatienten verantwortlich ist, bleibt noch im Dunkeln.

Eine Immunsuppression erhöht die Menge der EBV-Exkretion in den Rachen bei Personen, die früher virusinfiziert wurden. Die Zunahme an Transformationsereignissen im Bereich des Oropharynx, die sich aus der zunehmenden Virusreplikation ergeben, könnte als pathogenetisches Modell gelten (MILLER, 1985).

2.2.9.4.2 Pathologie

Mehrere Organe sind stark mit abnormen Lymphozyten infiltriert; dies betrifft die Speicheldrüsen, Lungen, Nieren, Milz und das KM. Auch leukämische Transformationen wurden beschrieben. Im Gegensatz zum BL ist die Zellpopulation auffallend heterogen. Diese Tumoren werden als lymphoblastische oder immunoblastische Sarkome, als retikulozelluläre oder histiozytäre Lymphome bezeichnet (MILLER, 1985).

2.2.9.4.3 Klinik

Die klinischen Symptome dieser Malignome hängen größtenteils von ihrer anatomischen Lokalisation ab. Sie treten im Mediastinum, in der Pleura, im ZNS und im Abdominal- sowie Mesenterialbereich auf. Sie breiten sich extensiv in der Lunge aus und können deshalb als eine diffuse Pneumonitis mit respiratorischem Versagen sichtbar werden (MILLER, 1985).

Im speziellen können Leistungsminderung, Müdigkeit, Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Juckreiz und Lymphdrüsenbeschmerzen als Allgemeinerscheinungen auftreten; des weiteren sind Lymphdrüsen-, Leber- und Milzschwellungen bekannt geworden.

2.2.9.4.4 Klinische Diagnose und Differentialdiagnose

Aufgrund der sehr diversen klinischen Bedingungen ergeben sich ungewöhnliche Spektren und Titer EBV-spezifischer AK. Sie können bei M. Hodgkin, Lymphomen, chronischen lymphozytären Leukämien, Karzinomen und Sarkomen, erworbenen oder erbten Immundefekten, immunsuppressiven Therapien oder Organ-Transplantationen zugrunde liegen.

In einigen Fällen weisen die Patienten erhöhte anti-VCA-IgG-Titer mit oder ohne nachweisbaren anti-EA(R)- oder anti-EA(D)-AKs auf. Die EBNA-AK bleiben im Normalbereich (W. u. G. HENLE, 1982) und haben bei vielen Personen mit disseminierten polyklonalen Lymphomen keinen erfaßbaren Titer (MILLER, 1985). Im Zusammenhang mit den oben genannten Erkrankungen ergaben sich vornehmlich erhöhte anti-VCA-Titer ($\geq 1/320$), so daß die GMTs 2-3fach über den Kontrollen lagen (W. u. G. HENLE, 1980). Bei KMs-Transplantationen vermag anti-VCA-IgG extrem hoch zu sein ($-1/20.480$), und überdies können anti-VCA-IgA- und -EA(D)-IgA-Titer nachweisbar werden. Die Immunsupprimierten scheiden das EBV in

vermehrtem Maße über den Oropharynx aus (LANGE et al., 1978), was sich serologisch nachvollziehen läßt.

Aus prognostischen und therapeutischen Gründen ist die histologische Absicherung der Einzeldiagnose durch bioptisches Material unerläßlich. Des weiteren sollen technische Verfahren wie z.B. die Computertomographie, Sonographie, Röntgenographie und Szintigraphie (v.a. auch hinsichtlich der Stadieneinteilung) zu Hilfe gezogen werden.

2.2.9.4.5 Therapie

Auf das breite Behandlungsspektrum EBV-korrelierter Lymphome bei Immunsupprimierten kann hier im einzelnen nicht eingegangen werden. Es beruht auf dem Angehen der *prima causa* und erstreckt sich von der chirurgischen Intervention über die RT bis hin zur Chemotherapie mit ihren sehr verschiedenen Programmen.

2.2.9.4.6 Immunologie

Für die immunologischen Defekte, die zu einer Verstärkung der anti-VCA- und anti-EA- und/oder einer Verminderung der anti-EBNA-Produktion führen, könnten verschiedene Fakten verantwortlich sein:

1. Ein Mangel oder eine Dysfunktion an T-Suppressor-Zellen verhindert das normale Abschalten der AK-Synthese durch B-Lymphozyten.
2. Das Fehlen oder die Dysfunktion von NKs oder ADCC-reaktiven Zellen läßt die MA-, EA- und VCA-Produktion in spontan induzierten EBV-tragenden B-Lymphozyten zum Abschluß kommen, wobei normalerweise solche Producer-Zellen durch NKs oder die ADCC-Reaktion zerstört würden, sobald virusspezifische MA-Komponenten auf ihren Membranen erscheinen.
3. Ein Verlust oder eine Dysfunktion an LYDMA-sensitiven T-Killerzellen erlaubt eine Zunahme der EBV-Genom tragenden B-Zell-Population. Auf diese Weise könnten mehr EBV-Genom tragende B-Zellen spontan in den lytischen Zyklus der Virusreplikation eintreten, obwohl der Prozentsatz der induzierten Zellen unverändert bleiben dürfte. Die Folge wären erhöhte MA-, EA- und VCA-, aber nicht angestiegene EBNA-Titer, die ihrerseits für eine verstärkte AK-Synthese sorgen würden (W. u. G. HENLE, 1982).

2.2.9.4.7 Prognose

Sie muß in Abhängigkeit vom histologischen Typ, Ausdehnungsgrad und von der Stadieneinteilung entsprechender Lymphome gesehen werden. Generell ist die Lebenserwartung mehr oder weniger stark beeinträchtigt, und die 5-Jahres-ÜLZ zeigt ein breites Spektrum (50-90 %). Beim Auftreten von Anämien und Thrombopenien ist von einer schlechten Prognose auszugehen.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

=====

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.1.1 Auswahlkriterien von 6 Antigenen des EBV-Genoms für die Peptid-synthese

Mit Hilfe eines Computer-Programmes, das auf den Richtlinien von CHOU und FASMAN (1974 a u. b) beruht, ist es möglich geworden, die Sekundärstruktur eines Proteins vorherzusagen. Dieses Programm wurde unter Einbeziehung von Anregungen von GOLUB (COHEN et al., 1984) in Fortran für DEC zur Anwendung auf VAX750 geschrieben (WOLF et al., 1987). Es legt die Algorithmen von CHOU und FASMAN (1978) oder GARNIER et al. (1978) zugrunde und überlagert die Voraussagen der Sekundärstruktur mit den lokalen Hydrophilizitätswerten (HOPP u. WOODS, 1981). Dazu wurden alternativ Werte für die Oberflächenwahrscheinlichkeit (modifiziert nach EMINI et al., 1985) oder Flexibilität (KARPLUS u. SCHULZ, 1985) eingesetzt. Die Auswertung für das wahrscheinliche Auftreten von α -Helices, β -Faltblattstrukturen, Zufallswindungen und β -Turns geschah nach den Chou-Fasman-Berechnungen unter strikten Bedingungen. Es erfolgte eine Mittelung der verschiedenen Parameter über 7-AS-Reste hinweg, wobei die Grenze für die Hydrophilizität auf 0.7, für die Oberflächenwahrscheinlichkeit auf 5.0 und für die Flexibilität auf 1.04 festgesetzt wurde.

β -Turnregionen, die an β -Faltblatt- oder helikale Strukturen in einer hydrophilen oder nicht hydrophoben Umgebung angrenzen und dort gleichzeitig mit hohen Werten für die Flexibilität und Oberflächenwahrscheinlichkeit kombiniert sind, werden als potentielle Antigenitätsstellen betrachtet (MODROW et al., 1987 a u. b). Sie bilden häufig flexible und schleifenähnliche Strukturen auf der Proteinoberfläche und sind daran auch als primäre Kandidaten für antigene Regionen zu erkennen (WOLF et al., 1987; MODROW et al., 1987 a u. b).

Es wurden aus dem Gesamtgenom 4 EBV-kodierte offene Leserahmen ausgewählt, nämlich BLLF1, BALF4, BILF1 und BILF2, deren Sequenzen alle typische Charakteristika für Transmembranregionen enthalten. Von den beiden ersten Leserahmen wurden jeweils 2 Regionen ausgewählt, die antigene Regionen darstellen (BLLF1, 502-514; BLLF1, 793-805; BALF4, 266-278 und BALF4, 675-688; QUALTIERE u. PEARSON, 1979; THORLEY-LAWSON

u. EDSON, 1979; PELLET et al., 1985; GONG et al., 1987). Von den beiden letzten wurde nur jeweils ein Epitop ausgesucht (BILF1, 123-135 und BILF2, 48-60); die in diesen Leserahmen codierenden Proteine wurden bisher noch nicht als Membranproteine identifiziert. Im einzelnen handelte es sich um folgende Aminosäuresequenzen:

1. BALF4 (266-278): $\text{NH}_2\text{-Gly-Thr-Asn-Pro-Gln-Gly-Glu-Arg-Arg-Ala-Phe-Leu-Asp-Cys-COOH} \Rightarrow 13 \text{ AS} + \text{Cys-COOH}$
2. BALF4 (675-688): $\text{NH}_2\text{-Arg-Lys-Asp-Leu-Asp-Asn-Ala-Val-Ser-Asn-Gly-Arg-Asn-Gln-Cys-COOH} \Rightarrow 14 \text{ AS} + \text{Cys-COOH}$
3. BLLF1 (502-514): $\text{NH}_2\text{-Lys-Ala-Pro-Asp-Met-Thr-Ser-Ser-Thr-Ser-Pro-Val-Thr-Cys-COOH} \Rightarrow 13 \text{ AS} + \text{Cys-COOH}$
4. BLLF1 (793-805): $\text{NH}_2\text{-Ala-Arg-Thr-Ser-Thr-Glu-Pro-Thr-Thr-Asp-Tyr-Gly-Gly-Cys-COOH} \Rightarrow 13 \text{ AS} + \text{Cys-COOH}$
5. BILF1 (123-135): $\text{NH}_2\text{-Thr-Leu-Ala-Leu-Phe-Ser-Arg-Thr-Pro-Arg-Thr-Ser-Cys-COOH} \Rightarrow 12 \text{ AS} + \text{Cys-COOH}$
6. BILF2 (48-60): $\text{NH}_2\text{-Val-Ser-Arg-Ile-Glu-Leu-Gly-Arg-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gly-Cys-COOH} \Rightarrow 13 \text{ AS} + \text{Cys-COOH}$

Das Cys kommt ausschließlich am terminalen Carboxylende vor und ist stets an ein Trägerharz (Resin) gebunden. Ohne diese AS an der terminalen Gruppe bauen sich die ausgewählten Peptide aus 17 verschiedenen AS auf und besitzen jeweils 13 ± 1 "Einzelbausteine".

In den anschließenden Abbildungen 2-9 werden Analysen zur Aminosäuresequenz der verschiedenen Proteine dargestellt, wobei die zur Peptidsynthese vorgesehenen Sequenzen streifenförmig gerastert sind (Abb. 2, 4, 6 u. 8). Bei den zweidimensionalen Darstellungen (Abb. 3, 5, 7 u. 9) sind α -Helices () , β -Faltblattstrukturen () , Zufallswindungen () und β -Turns () eingezeichnet. Die hydrophilen Regionen werden durch Ovale () , die hydrophoben durch Rauten () gekennzeichnet und über den Mittelwert von 7 angrenzenden AS berechnet. Die Größe der eingezeichneten Ovale oder Rauten korreliert mit dem Ausmaß der Hydrophilizität bzw. Hydrophobizität.

3.1.2 Festphasen-Synthese

Die Methodik der Peptidsynthese ist auf MERRIFIELD (1963) zurückzuführen, der die Herstellung eines Tetrapeptids (Leu-Ala-Gly-Val) als Modell durchführte. Da sich die wachsende Peptidkette an einer völlig

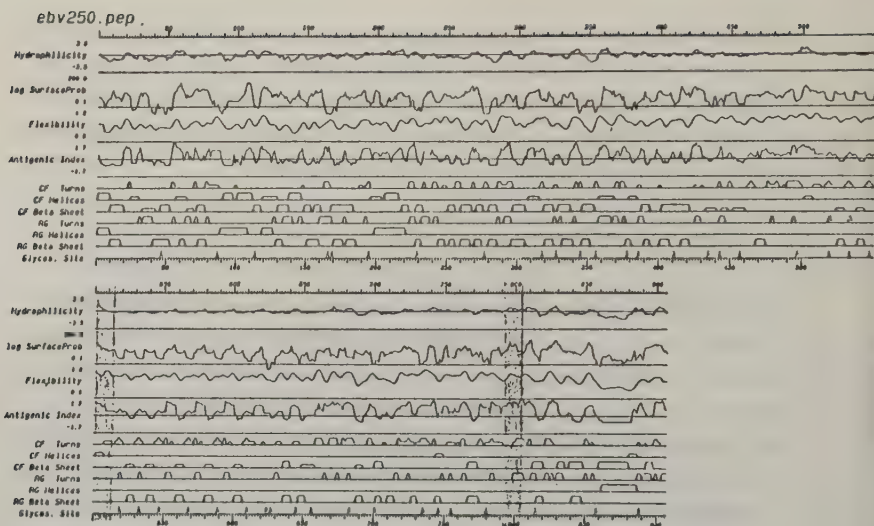


Abb. 2: Aminosäuresequenzanalyse des Leser Rahmens BLLF1 des EBV-Genoms, aus dem 2 Epitope für die Peptidsynthese ausgewählt wurden (502-514 u. 793-805; streifenförmig gerastert). Näheres s. unter 3.1.1.

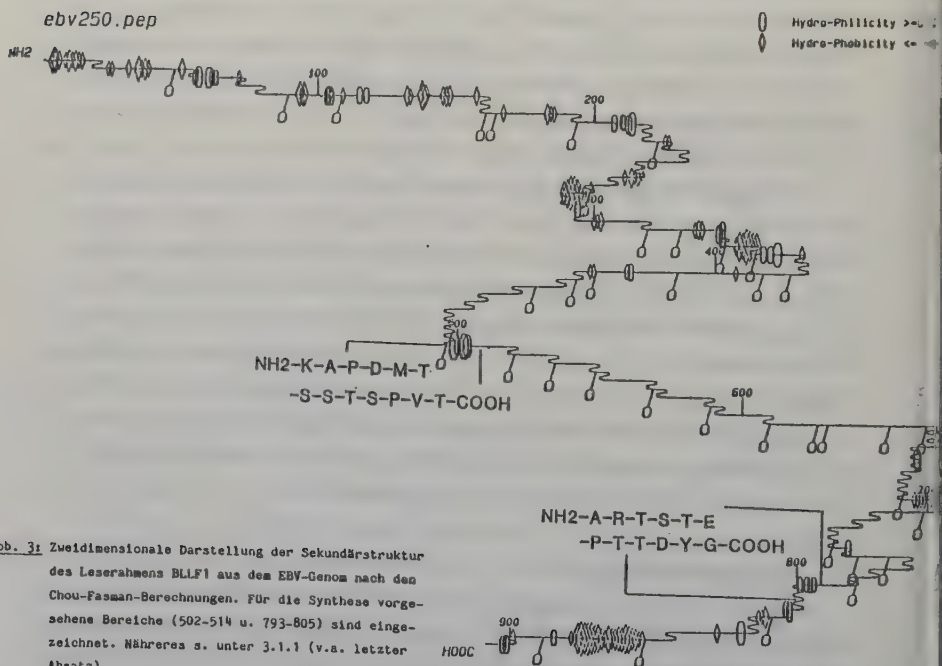


Abb. 3: Zweidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur des Leser Rahmens BLLF1 aus dem EBV-Genom nach den Chou-Fasman-Berechnungen. Für die Synthese vorge-sehene Bereiche (502-514 u. 793-805) sind einge-zeichnet. Näheres s. unter 3.1.1 (v.a. letzter Absatz).

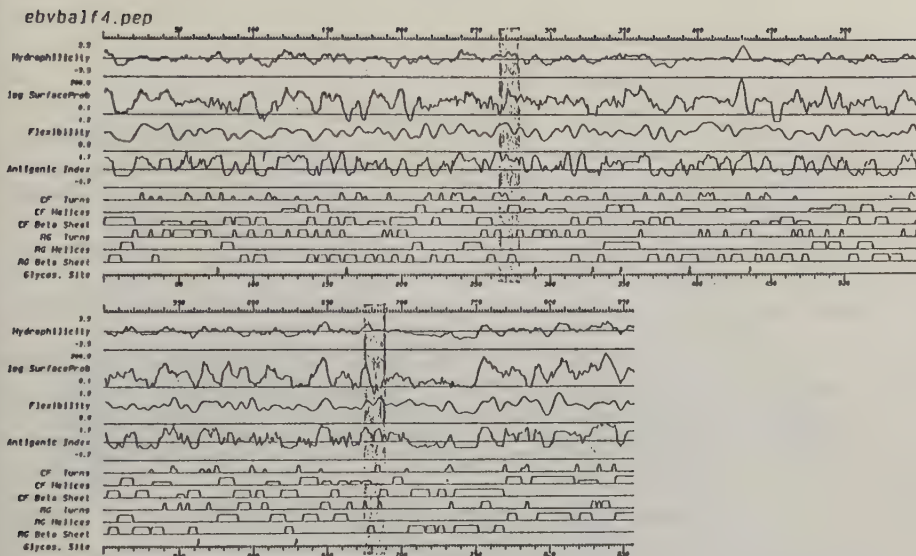
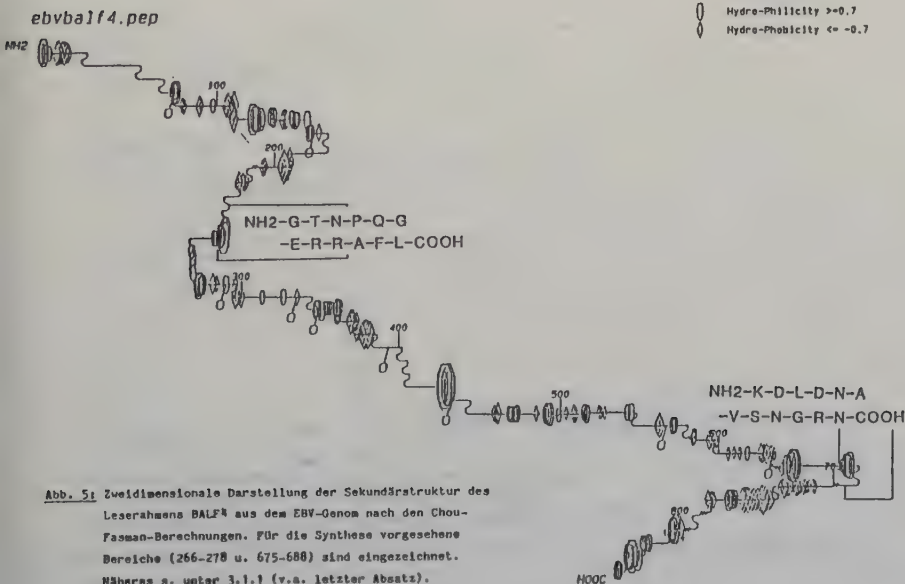


Abb. 4: Aminosäuresequenzanalyse des Leser Rahmens BALF₄ des EBV-Genoms, aus dem 2 Epitope für die Peptidsynthese ausgewählt wurden (266-278 u. 675-688; streifenförmig gerastert). Näheres s. unter 3.1.1.



ebvbilf1.pep

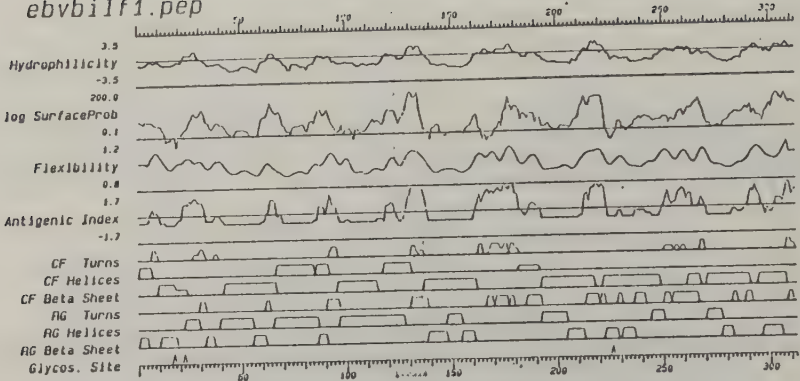


Abb. 6: Aminosäuresequenzanalyse des Leser Rahmens BILF1 des EBV-Genoms, aus dem 1 Epitop für die Peptidsynthese ausgewählt wurde (123-135; streifenförmig gerastert). Näheres s. unter 3.1.1.

ebvbilf1.pep

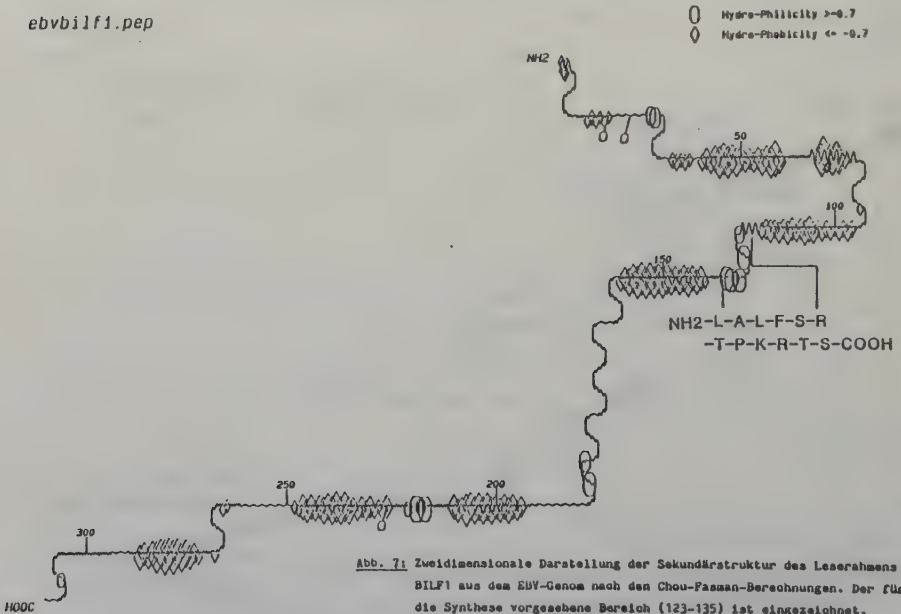


Abb. 7: Zweidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur des Leser Rahmens BILF1 aus dem EBV-Genom nach den Chou-Fasman-Berechnungen. Der für die Synthese vorgesehene Bereich (123-135) ist eingezeichnet. Näheres s. unter 3.1.1 (v.a. letzter Absatz).

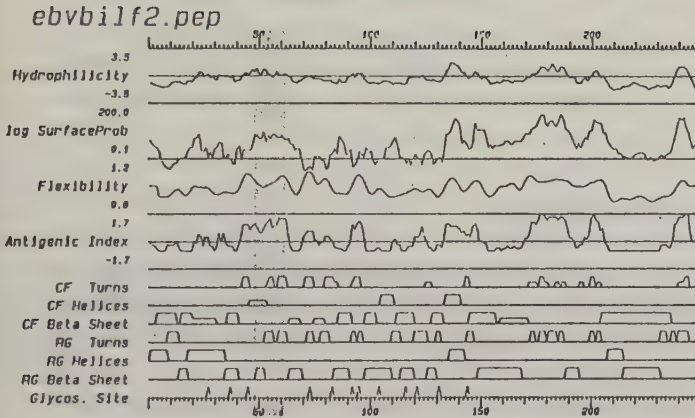


Abb. 8: Aminosäuresequenzanalyse des Leserahmens BILF2 des EBV-Genoms, aus dem 1 Epitop für die Peptidsynthese ausgewählt wurde (48-60; streifenförmig gerastert). Näheres s. unter 3.1.1.

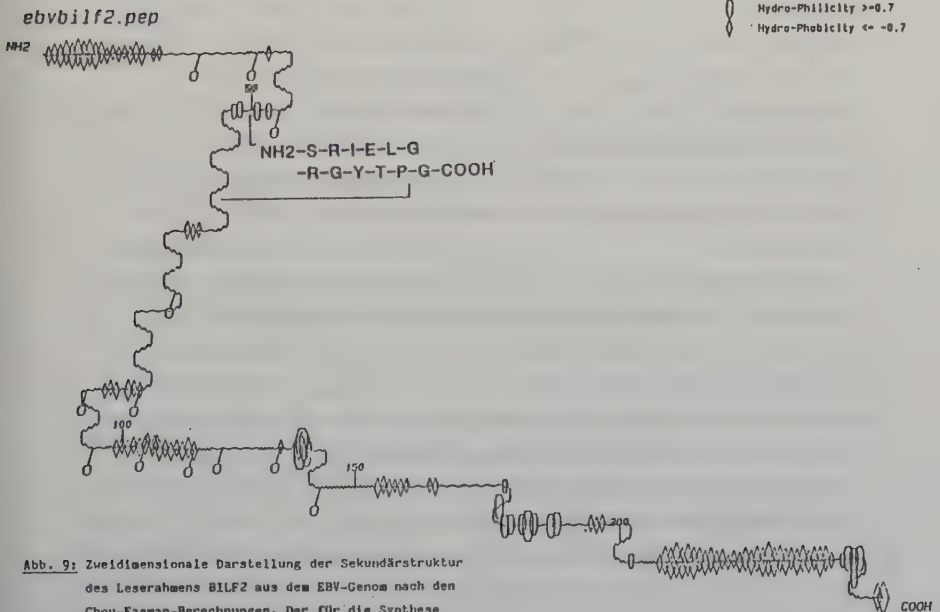


Abb. 9: Zweidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur des Leserahmens BILF2 aus dem EBV-Genom nach den Chou-Fasman-Berechnungen. Der für die Synthese vorgesehene Bereich (48-60) ist eingezeichnet. Näheres s. unter 3.1.1 (v.a. letzter Absatz).

unlöslichen Phase befand, wurde von ihm zur Beschreibung des neuen Verfahrens der Begriff "Festphasen-Peptidsynthese" eingeführt. Diese Technik wurde schrittweise weiterentwickelt (STEWART u. YOUNG, 1969; DOSCHER, 1977) und ist heute in einem Handsynthese-Gerät (Firma Peninsula) sowie vollautomatisiert (APPLIED BIOSYSTEMS, 1984 a, 1984 b u. 1985) durchführbar. Bei der Herstellung der 6 ausgewählten Antigene des EBV kamen beide Verfahren zum Einsatz.

3.1.2.1 Verwendete Aminosäuren

Mit einer einzigen Ausnahme wurden Boc-geschützte L-Aminosäuren der Firmen Applied Biosystems, Peninsula und Sigma verwendet. Lediglich das Arg hatte an seiner α -Aminogruppe eine Aoc-Schutzgruppe; dieses Derivat ist in DCM löslich.

In beiden Syntheseverfahren wurde grundsätzlich vom Carboxyl- zum Amino-Ende hin stufenweise vorgegangen. Als Harz wurde ein kommerziell erhältliches Präparat, das N-t-Boc-S-Methoxybenzyl-Cystein als 1. Aminosäure enthielt, verwendet. An das Cys des Harzes wurde dann die 1. Aminosäure des entsprechenden Antigens angekoppelt. Für die Gesamtsynthese wurden folgende AS-Verbindungen gewählt:

N-t-Boc-L-Ala	N-t-Boc-L-Leu-H ₂ O
N-t-Aoc-N-Tosyl-L-Arg	N-t-Boc-L-Met
N-t-Boc-L-Asn	N-t-Boc-L-Phe
N-t-Boc-L-Asp- β -Benzyl-Ester	N-t-Boc-L-Pro
N-t-Boc-L-Gln	N-t-Boc-O-Benzyl-L-Ser
N-t-Boc-L-Glu- γ -Benzyl-Ester	N-t-Boc-O-Benzyl-L-Thr
N-t-Boc-Gly	N-t-Boc-O-2,6-Dichlorobenzyl-L-Tyr
N-t-Boc-L-Ile $\cdot$ 1/2H ₂ O	N-t-Boc-L-Val
α -N-t-Boc- ϵ -o-Chlorobenzylloxycarbonyl-L-Lys-t-Butyl-NH ₂ .	

In Anlehnung an HOPP (1984) wurde zur Immunisierung von Kaninchen an das NH₂-Ende der fertiggestellten Antigene mit dem Handsynthese-Gerät ein Carrier angeknüpft. Dieser bestand aus -Gly-Gly-Lys-Di-PS:

N-t-Boc-Gly (wie innerhalb der Kette)

N α , ϵ -di-Boc-L-Lys (B-9255/Sigma)

Palmitinsäure (Sigma P.0500).

3.1.2.2 Handsynthese-Verfahren

3.1.2.2.1 Anordnung des Peptid-Synthesizers (Fa. Peninsula)

Eine N_2 -Flasche, die durch einen Teflonschlauch mit der Apparatur verbunden ist, stellt quasi den "Motor" der gesamten Funktionsabläufe dar, denn jeder Einzelschritt beim Reagenzientransport und Reaktionsablauf beruht auf einem N_2 -Druck.

Die Vorderfront des Gerätes bildet ein "Armaturenbrett", von dem aus die gesamte Bedienung möglich ist. Der Synthesizer besitzt 2 Haupteinheiten: eine Meß- oder Vorratskammer und eine Reaktionskammer. Durch eine Wählscheibe mit 8 verschiedenen Positionen können aus der entsprechenden Anzahl an Vorratsflaschen die gewünschten Mengen von Reagenzien bzw. Lösungsmitteln separat in den Meßkolben überführt werden. Er ist bis zu 125 ml skaliert, und jede Vorratsflasche hat durch einen Teflonschlauch zum Sammelstück des Meßkolbens eine direkte Verbindung. Die verschiedenen Flaschen sind folgendermaßen beschriftet:

1. DCM (Dichlormethan, Fa. Merck 6050)
2. Et-OH (Ethanol, Fa. Merck 953)
3. 25%iges TFA (Trifluoressigsäure) in DCM
4. DCM (Dichlormethan, Fa. Merck 6050)
5. Et-OH (Ethanol, Fa. Merck 953)
6. 10%iges Et_3N (Triethanolamin, Fa. Merck 8379) in DCM
7. DCM (Dichlormethan, Fa. Merck 6050)
8. 5 % DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) in DCM.

Mit Hilfe zweier Funktionshebel und eines Teflonschlauch-Systems sind prinzipiell 3 verschiedene Arbeitsgänge möglich:

1. die Überleitung von Reagenzien aus dem Meßkolben in den Reaktionskolben,
2. die Weiterleitung von Abfallprodukten (z.B. Lösungsmitteln) aus dem Reaktionskolben in einen Sammelkanister und
3. die permanente N_2 -Zufuhr in die Reaktionskammer während der Reaktionszeit.

Das letztere geschieht über ein kolbenartig erweitertes Siebstück am freien Ende eines Teflonschlauches, welches nur knapp über dem Boden der Reaktionskammer hängt. Ein Regelventil erlaubt die stufenlos dosierbare N_2 -Zuleitung ins Reaktionsgefäß und damit eine ständige Agitation des Reaktionsgemisches. Dies gewährt schließlich die gleichmäßige Verteilung und Bewegung von Lösungsmitteln und Reagenzien in der Kammer während der Reaktionszeit.

3.1.2.2 Funktionsweise des Peptid-Synthesizers (Fa. Peninsula)

Die Funktionshebel wurden auf 0 gestellt und die N_2 -Zufuhr durch eine Ventilschraube gestoppt. Nach dem Abschrauben der Reaktionskammer wurde das Trägerharz mit Cys als erster Aminosäure hinzugegeben und 6 x 1,5 min. mit je 30 ml DCM gewaschen. Anschließend wurde die 1. AS der ausgewählten Sequenz in einem 4 molaren Überschuß bezüglich der Menge von Cys in ca. 20 ml DCM aufgelöst und zusätzlich mit 0,3 ml konzentriertem Et_3N versetzt. Diese Lösung wurde an der Stelle eines Verschußspundes in die Reaktionskammer einpipettiert und in ihr unter N_2 -Zufuhr für 5 min. agitiert. Bezüglich der Cys-Menge wurde DCC in 3 molarem Überschuß in 30 ml DCM gelöst und in den Reaktionskolben gegeben. Das gesamte Gemisch mußte bei schwacher N_2 -Zufuhr für mindestens 2 h agitiert werden. Falls diese Reaktion über Nacht ablief, waren wegen der Verdunstung zusätzlich etwa 100 ml DCM für die beiden Haupteinheiten erforderlich (s. Tab. 5, 11.-15.).

Nach Ablauf dieses Reaktionsschrittes wurde die Reaktionskammer abgesaugt. In ihr blieb lediglich das Harz mit den gebundenen AS zurück. Dieses Reagens war 3 x 1,5 min. in je 30 ml DCM zu waschen. Dann wurde mit einer Pasteurpipette in den Resin-Rest gestochen und eine Glasspitzenprobe entnommen, mit der der Kaisertest durchgeführt wurde. Er dient dem Nachweis freier Aminogruppen und somit der Vollständigkeit einer AS-Kopplung nach jedem Einzelschritt (KAISER et al., 1970). Als Indikator muß er nach einer kompletten Bindung gelb sein, da alle freien NH_2 -Gruppen blockiert sind. Außerdem zeigt die Lösung klare Beads. In diesem Fall wird die Ninhydrinprobe als negativ bezeichnet. Nach KAISER et al. (1970) tritt eine Gelbfärbung dann auf, wenn $> 99\%$ der freien Aminogruppen gebunden sind (s. Tab. 5, 1.-2.). Eine Darstellung der Ninhydrinprobe erfolgt im Anschluß an diesen Unterpunkt.

Fällt der Kaisertest (Tab. 5, 2.) dagegen positiv aus, d.h. es liegt eine mehr oder weniger blau getönte bis bläulich-gelbe Lösung incl. entsprechend gefärbter Beads vor, so müssen die Reaktionsschritte 10.-15. und 1.-2. (s. Tab. 5) sooft wiederholt werden, bis der Kaisertest (2.) durch seine Gelbfärbung eine komplette AS-Bindung indiziert. Nur bei 2 AS, dem Pro und Asp, kann sich selbst nach einer kompletten Kopplung, d.h. einem negativen Kaisertest (2.), die Ninhydrinfärbung als braun bis rötlich-braun erweisen.

Datum: 12. 9. 1985	Peptid: BALF 4 (266-278)
Reaktion:	Resin-Cys-Asp-Leu-Phe-Ala + Arg
MG der AS:	442,5
Polymer-Substitution:	0,61 meq/g
Gramm Polymer:	2,5 g $\hat{=}$ 1,5 meq
Gramm AS:	2,66 g $\hat{=}$ 442,5 x 1,5 x 4/1000 g $\hat{=}$ 6 mmol

Reaktionsschritte	Zeit (min.)			
1. CH_2Cl_2 (3 x 1,5' à 30 ml)		✓	✓	✓ 5
2. Kaisertest (negativ)	Gelbfärbung (d.h. > 99 % der NH_2 -Gruppen sind gebunden)			
3. Et-OH (3 x 1,5' à 30 ml)		✓	✓	✓ 5
4. CH_2Cl_2 (3 x 1,5' à 30 ml)		✓	✓	✓ 5
5. 25% TFA in CH_2Cl_2 (30 ml)	Agitation bei schwacher N_2 -Zufuhr			
6. CH_2Cl_2 (3 x 1,5' à 30 ml)		✓	✓	✓ 5
7. Kaisertest (positiv)	Blaufärbung (d.h. Nachweis freier NH_2 -Gruppen)			
8. Et-OH (3 x 1,5' à 30 ml)		✓	✓	✓ 5
9. CH_2Cl_2 (3 x 1,5' à 30 ml)		✓	✓	✓ 5
10. 10% Et_3N in CH_2Cl_2 (3 x 3,5' à 30 ml)	✓	✓	✓	✓ 10
11. CH_2Cl_2 (3 x 1,5' à 30 ml)		✓	✓	✓ 5
12. CH_2Cl_2 (3 x 1,5' à 30 ml)		✓	✓	✓ 5
13. Boc-AS (Aoc-Arg)	Auflösung in 20 ml CH_2Cl_2 und			
14. Konzentriertes Et_3N	Zugabe von 0,3 ml konz. Et_3N			
15. 5 % DCC in CH_2Cl_2 (30 ml) bei schwacher N_2 -Zufuhr für mindestens 2 h agitieren lassen (Falls die Reaktion über Nacht abläuft, sind ca. 100 ml wegen Verdunstung erforderlich.)				

Chemikalienwechsel: Gesamtzeit für das Zu- und Abpumpen von Lösungsmitteln und Hantieren mit sonstigen Reagenzien	25
=====	
Gesamtzeit zum Ankoppeln einer einzigen AS an eine Peptidkette	240

Tab. 5: Schematische Darstellung der gesamten Reaktionsschritte zum Ankoppeln einer einzigen AS im Handsynthese-Gerät (Fa. Peninsula).

Erst nach einer negativen Ninhydrinprobe darf der schematisch wiedergegebene Syntheseyklus (s. Tab. 5) fortgesetzt werden. Es wurde 3 x für 1,5 min. mit je 30 ml Ethanol gewaschen und anschließend 3 x für 1,5 min. mit je 30 ml DCM (Tab. 5, 3.-4.). Die Abspaltung der Schutzgruppen (Boc bzw. Aoc) an der α -Aminogruppe geschah über 1/2h mit 30 ml einer 25%igen TFA/DCM-Lösung unter schwacher N_2 -Zufuhr in die Reaktionskammer (Tab. 5, 5.). Bei der Weiterführung wurde abermals 3 x für 1,5 min. mit je 30 ml DCM gewaschen und erneut der Kaisertest durchgeführt (Tab. 5, 6.-7.). Aufgrund der freien NH_2 -Gruppen, die von ihren Schutzgruppen durch TFA entkoppelt wurden, ergab sich nun bereits nach 2 min. eine dunkelblaue Farbe der Beads und Lösung, die Ninhydrinprobe fiel also positiv aus. Würde sie negativ bleiben, so müßte der Abspaltungsschritt der Schutzgruppen bis zum Auftreten einer Blaufärbung wiederholt werden - eine Maßnahme, die bei obiger Synthese niemals erforderlichlich war.

Im Anschluß an den positiven Kaisertest wurde in der gleichen Weise wie nach dem negativen mit Ethanol und DCM gewaschen (Tab. 5, 8.-9.). Um die H^+ -Ionen des TFAs zu entfernen, wurde 3 x für 3,5 min. mit je 30 ml einer 10%igen Et_3N /DCM-Lösung und 6 x für 1,5 min. mit je 30 ml DCM gewaschen (Tab. 5, 10.-12.). Bei azidolytischen Abspaltungsvorgängen ist es notwendig, die protonisierte α - NH_2 -Gruppe zu neutralisieren. Dies geschah durch die 10%ige Triethanolamin/DCM-Lösung (DOSCHER, 1977).

Endlich schloß sich mit dem Auflösen der nächsten AS in ca. 20 ml DCM der Reaktionszyklus zum Anhängen einer einzigen AS und es wurde in der oben beschriebenen Art die Synthese systematisch fortgesetzt. Mit dem Durchführen der Reaktionsschritte 13 bis 15 (Tab. 5) wurde das gezeigte Versuchsprotokoll abgeschlossen und dann für die nächste AS von neuem in der geschilderten Weise vollzogen, bis schließlich die gewünschte Kettenlänge erreicht war.

Bei der 3. AS einer Kette oder bei Gln wurde der 15. Reaktionsschritt dem 13. und 14. (Tab. 5) vorgezogen (MODROW, persönliche Mitteilung). Schwer lösliche AS, wie z.B. Asn und Gln, wurden in DMF anstatt in DCM aufgelöst (Tab. 5, 13.); unter dieser Voraussetzung erfolgte auch die Auflösung von DCC in DMF (Tab. 5, 15.).

Beim Ankoppeln des Carriers an die verschiedenen Antigene wurde bei der Lösung des α , ϵ -di-Boc-Lys' kein konzentriertes Et_3N hinzugefügt (Tab. 5, 14.). Durch die separate Auflösung von PS und DCC in DMF anstatt in DCM ließen sich bessere Kopplungsergebnisse erzielen. Von der

gewonnenen Gesamtmenge der einzelnen Peptide wurden zum Anhängen der Endgruppe (-Gly-Gly-Lys-Di-PS) zwischen 34-37 % entnommen, das entsprach einem Gewicht von 0,45-0,5 g.

3.1.2.2.3 Kaisertest beim Synthese-Verfahren

Es handelt sich dabei um einen Farbttest zum Nachweis freier Amino-
gruppen bei der Festphasen-Synthese (KAISER et al., 1970). Er dient
zum Nachweis einer vollständigen AS-Kopplung nach jedem Einzelschritt
und hilft so, die Bildung einer unvollständigen Peptidkette zu vermei-
den. Der Test selbst basiert auf der Reaktion von Ninhydrin mit klei-
nen Proben des Peptidharzes. Zur Durchführung werden 3 verschiedene
Lösungen benötigt:

1. 40 g Phenol in 100 ml Ethanol
2. 98 ml Pyridin + 2 ml 0,5 M KCN
3. 1% Ninhydrin in Ethanol.

Mit einer Pasteurpipette wurde eine Harzprobe entnommen. Nach dem Zu-
geben von 2-3 Tropfen von jedem der obigen Reagenzien wurde das gesam-
te Reagens 5 min. lang in einem Heizblock bei 105°C erhitzt. Eine
Gelbfärbung indiziert eine komplette Bindung, d.h. es sind keine freien
Aminogruppen mehr vorhanden. Eine inkomplette Kopplung wird dann ange-
zeigt, wenn sich irgendeine blaue Farbe auf den Beads oder in der Lö-
sung entwickelt. Diese Methode gilt als hochempfindlich, denn es kön-
nen noch bis zu 5 µmol/g an freien Aminogruppen nachgewiesen werden.

3.1.2.3 Vollautomatisierte Peptidsynthese

3.1.2.3.1 Anordnung des Peptid-Synthesizers 430 A (Applied Biosystems)

Die gesamten Arbeitsschritte werden über einen Mikrocomputer dirigiert,
in den durch digitale Berührung entsprechender Monitor-Positionen die
gesamten AS-Sequenzen für die verschiedenen Antigene einprogrammiert
und anhand eines Ausdrucks nochmals überprüft werden. Mittels Bild-
schirm-Berührung lassen sich die vorgegebenen Einzelsequenzen abrufen
und die gewünschten Synthesen separat starten.

Zur Kontrollmöglichkeit der Syntheseeffizienz ist für die automa-
tische Probenentnahme aus dem Reaktionsgefäß ein Harzsammler ange-
schlossen. In den Reagenzglasständer sind pro Kopplungszyklus 2 Röhr-
chen einzustellen und entsprechend zu beschriften. Dabei enthält das

1. (z.B. 5a) nur Lösungsmittel und das 2. (z.B. 5b) die Resin-Probe. Dagegen befindet sich bei Doppelbindungen das Resin der 1. bzw. 2. Kopplung im 1. bzw. 2. Gläschen (z.B. 4a u. 4b). Bei unserem Syntheseverfahren wurden lediglich Arg, Gln und Asn doppelt gebunden.

Die AS werden nach der vorgeschriebenen Reihenfolge des zu synthetisierenden Peptides in Querstreifen-kodierten Kartuschen auf der Führungsschiene vorn am Synthesizer eingestellt, wobei die obigen Doppelkopplungen in entsprechender Weise zu berücksichtigen sind. Dieser Code dient der Identifizierung verschiedener AS und der Kontrolle ihrer spezifischen Reaktionsparameter.

Sämtliche Reagenzien und Lösungsmittel werden - wie beim Handsynthese-Gerät - durch einen N_2 -Druck zu- und abgeleitet. Sie befinden sich im unteren Kompartiment des Synthesizers und werden - ebenfalls durch Teflonschläuche - mit bestimmten Funktionseinheiten verbunden. Außerdem sind in diesem Teil 4 Abfallgefäße (à 2,5 l) installiert, die mit Hilfe eines Schlauchsystems im Ablauf der Synthesevorgänge gefüllt werden können; dabei wird stets nacheinander in einer konkreten Reihenfolge (1-4) von links nach rechts vorgegangen. Die Maschine wirft die entleerten AS-Kartuschen automatisch in einen Container innerhalb des Reagenzien-Abteils. Sie stehen dann für eine erneute Beschickung zur Verfügung.

3.1.2.3.2 Funktionsabläufe beim Peptidsynthesizer 430 A (Applied Biosystems)

Innerhalb eines Synthesesyklus¹ werden 3 Funktionsschritte vollzogen, die für die verschiedenen AS spezifiziert sind; die Aktivierung, die Konzentrierung incl. dem Lösungsmittelaustausch und schließlich die Kopplung. Das Gerät verfügt bei jedem der 3 funktionellen Basisvorgänge über separate Gefäße. Nachdem die richtigen AS-Kartuschen in Abfolge der vorgegebenen Peptidsequenz in die Leitschiene eingestellt sind, wird der Durchlauf am Monitorschirm gestartet. Der 430 A Synthesizer führt die 1. Kartusche in eine Arretierung ein, liest den Querstreifencode ab und vergleicht ihn mit dem vorliegenden Syntheseauftrag. Das Gerät durchsticht mit einer Nadel den Gummistopfen der verplombten Kartusche, löst die AS durch die Zuleitung von Lösungsmittel und überführt sie ins Aktivierungsgefäß. Ein Zyklus verläuft mit wenigen Ausnahmen nach dem gleichen Grundprinzip wie in Tab. 5 detailliert dargestellt wurde, allerdings in einer wesentlich kürzeren Zeit. Die

Abspaltung der α -Amino-Schutzgruppen erfolgt durch TFA (Applied Biosystems 400.137). Im Gegensatz zum Handsynthese-Verfahren werden die H^+ -Ionen des TFAs nicht durch eine 10%ige Et_3N/DCM -Lösung, sondern durch DIEA (Applied Biosystems 400.136) neutralisiert. Kurz vor der Bindung werden nur Arg, Asn und Gln mit HOBT (Applied Biosystems 400.139) und DCC aktiviert, alle anderen AS werden mit DCC in symmetrische Anhydride umgelagert.

Im 2. Gefäß erfolgt die Konzentrierung. Dabei wird DCM als Lösungsmittel durch DMF (Applied Biosystems 400.143) ersetzt.

Schließlich vollzieht sich im 3. Gefäß die Kopplungsreaktion. Die Vortexbewegung liefert eine komplette Harz-Flüssigkeits-Interaktion und verhindert die Agglomeration des Syntheseharzes. Dadurch wird eine ökonomischere Herstellung mit kleinst möglichen Stoffvolumina erreicht.

Die AS werden im 2molaren Überschuß als symmetrische Anhydride eingesetzt. Im Gegensatz zum Handsynthese-Verfahren geschah das Waschen mit MeOH (Applied Biosystems 400.138), nicht mit EtOH.

Die Ninhydrinprobe erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie unter 3.1.2.2.3 beschrieben wurde. In den Gläschen des Fraktionssammlers wurde das Harz mit DCM/MeOH (6:4) von der Wand abgespült. Nach der Bildung eines Resin-Sediments saugte man den Überstand mit einer Pasteurpipette bis zu einer Pegelhöhe von ca. 1 cm Lösungsmittel ab und brachte die Röhrchen über 1-2 h in einer Speedvac zum Trocknen. Bei Bedarf konnten die Einzelproben nochmals in einen Exsikkator gebracht werden, bevor ihr Gewicht bestimmt wurde. Schließlich wurden in derselben Relation wie beim Handsynthese-Verfahren folgende Reagenzien hinzugegeben:

1. 25 μ l Phenol/EtOH (Applied Biosystems 400.219)
2. 50 μ l KCN/Pyridin (Applied Biosystems 400.220)
3. 25 μ l Ninhydrin/EtOH (Applied Biosystems 400.218).

Zusätzlich wurde eine Blind- (ohne Harz) und eine Kontrollprobe (Resin mit bekanntem Wert) angelegt. Die gesamten Röhrchen brachte man für 7 min. in einen Heizblock (100°C), fügte anschließend jeweils 4,9 ml einer 60%igen EtOH-Lösung (Applied Biosystems 400.221) hinzu, vermischte sie kurz und stellte sie schließlich auf Eis. Das Harz ließ man sedimentieren und der Überstand wurde spektralphotometrisch gemessen.

Der Vergleich zwischen Leer- und entsprechenden Resin-Werten erlaubt einen Rückschluß auf die Qualität der jeweiligen Bindung. Da gebundene AS mit dem Trägerharz sedimentieren, sollten nach einer kom-

pletten Kopplung bei der gleichen AS die Extinktionen des Lösungsmittels und der Resin-Probe (z.B. 5a u. 5b, s. unter 3.1.2.3.1) nur minimal differieren. Befinden sich dagegen ungebundene AS in der Lösung, so steigt der Extinktionswert entsprechend ihrer Konzentration an. Wegen eines anderen Resins ist bei der vollautomatischen Synthese der negative Ninhydrintest farblos. Bei einer positiven Reaktion zeigt die Lösung proportional zum Ausmaß der inkompletten Bindung ein hell- bis dunkelblaues Farbspektrum. Ggf. sind entsprechende Kopplungen, wie bereits beschrieben, zu wiederholen. Zwar wären auch beim Kaisertest im Handsynthese-Verfahren Extinktionsmessungen möglich gewesen, jedoch gilt diese Farbreaktion als derart empfindlich, daß prinzipiell die Qualität der Peptidbindung visuell annähernd beurteilt und das weitere Syntheseverfahren davon abhängig gemacht werden kann. Dies würde im übrigen auch im Rahmen der vollautomatisierten Produktion zutreffen (MERTZ, persönliche Mitteilung).

3.1.3 HF-Abspaltung bei den synthetisierten Peptiden

Durch den Einsatz von HF wurden die hergestellten Peptide von ihren Feststoffträgern (Resins) und Seitenketten-Schutzgruppen abgespalten. Wegen der hohen Toxizität des HFs war eine spezielle Apparatur erforderlich, deren Rohrsystem aus Polyfluoräthylen besteht, da dieser Kunststoff gegen HF vollkommen stabil sein soll (DOSCHER, 1977). Es mußte grundsätzlich unter dem Abzug gearbeitet werden.

Die Anlage wurde zunächst mit einer Pumpe evakuiert und mit einem Manometer auf ihre Abschlußdichte überprüft. Falls die Quecksilbersäule abfällt, muß nach einem Leck gesucht werden. Die Anordnung besteht - vereinfacht dargestellt - aus einem HF-Gefäß, 2 Reaktionsgefäßen, einem Adsorptionszylinder, einer Kühlfalle aus Glas, einer Pumpe und einem Kontrollmanometer. Ein Rohr-Schlauch-System gewährleistet die gegenseitige Verbindung und enthält 5 Absperrventile, mit denen durch T-Hähne verschiedene Funktionsrichtungen hergestellt werden können (s. Abb. 10).

Die Abspaltung konnte bei 2 Peptiden parallel durchgeführt werden. Da von jedem Antigen jeweils 2 Untergruppen vorlagen, nämlich eine Peptidmenge mit und ohne PS-Anteil ($\hat{=}$ ca. 1/2), spaltete man bei diesen im gleichen Arbeitsgang die Resinträger und Seitenketten-Schutzgruppen ab. Hierbei befand sich im Reaktionsgefäß I stets die Peptidmenge mit und in II die ohne Fettsäure des gleichen Epitops.

In die Reaktionskolben wurde die doppelte Menge des darin befindlichen Peptides an Thioanisol hinzugefügt und die Gefäße wurden an der Abspaltungsapparatur fest angeschraubt. Die beiden Kolben wurden in flüssigem N_2 ($-196^\circ C$) für 15 min. eingefroren. Durch die Öffnung der T-Hähne 2 bis 4 ließen sich in jeden Kolben ca. 10 ml HF überführen (Dauer ca. 30 min.). Anschließend wurden die Gefäße I und II bei Raumtemperatur aufgetaut, bis die in ihnen befindlichen Magnetfische mit Hilfe eines untergestellten Rührmotors gedreht werden konnten. Sobald dies eintrat, wurde das entsprechende Gefäß in Eiswasser gestellt und der Inhalt für weitere 15 min. gerührt. Dabei fiel auf, daß die Peptide mit dem Di-PS-Konjugat eine braun-rote Farbe einnahmen, während die ohne Carrier einen Gelbton zeigten.

Nun wurde die Kühlfalle in einen Styroporbehälter mit flüssigem N_2 gestellt und die Vakuumpumpe eingeschaltet. Bei offenem T-5-Hahn wurden die Ventile 3 und 4 von den Reaktionsgefäßen ganz langsam geöffnet, bis nach ca. 30 min. die vertikale Stellung (totale Öffnung) erreicht war. Über einen Zeitraum von 3 h wurde jetzt HF in den Adsorptionszylinder gesaugt, wo er zusammen mit CaO in CaF_2 und H_2O umgewandelt und damit entgiftet wurde. Zur Vermeidung eines Siedeverzugs wurde das Gemisch gerührt, und die Reaktionskolben wurden stets in Eiswasser gekühlt, um Nebenreaktionen möglichst gering zu halten.

Im Anschluß daran wurden die Proben in je 50 ml Ethylazetat 5 min. gerührt und durch einen G2-Glasfilter mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe filtriert. Dieser Waschvorgang mußte vier- bis fünfmal wiederholt werden, bis die Lösung weiß und klar erschien. Die Filtrerrückstände kamen dann zum Trocknen in einen Exsikkator, wurden daraufhin mit je 50 ml 1,5%igem NH_4HCO_3 versetzt und für 30 min. mittels Rührer gerührt. Nach der Bestimmung des Leergewichts von 2 Erlenmeyerkolben filtrierte man in diese die jeweilige Peptidlösung. Dabei verblieb das Resin incl. ungewünschter Schutzgruppen im Filtrerrückstand, es wurde getrocknet und aufbewahrt. Das Filtrat enthielt das gelöste Peptid, wurde im Kolben mit flüssigem N_2 eingefroren und in der Lyophile bei $-2-4^\circ C$ über 2-3 Tage gefriergetrocknet. Endlich ließ sich nach der Trocknung durch ein erneutes Wiegen der Kolben das Gewicht der Peptide bestimmen. In der geschilderten Weise war bei allen 6 Antigengruppen zu verfahren.

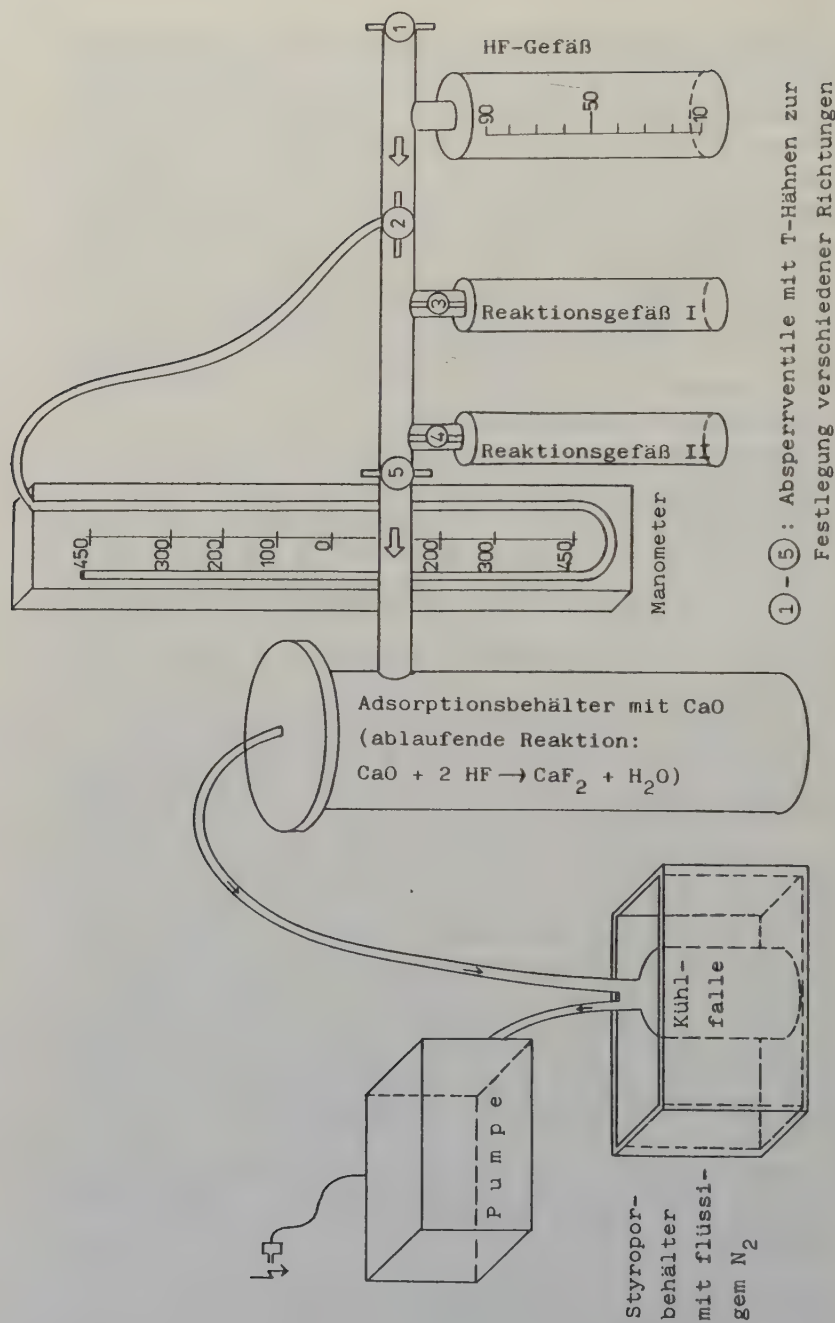


Abb. 10: Schematische Darstellung der Anlage für die HF-Abspaltung synthetisierter Peptide.

3.1.4 Peptidreinigung

Um ein synthetisiertes Peptid für die Diagnostik oder Immunisierung verwenden zu können, ist dessen Reinigung unabdingbar. Für diesen Zweck stehen Gelfiltrations-Säulen und Biogele mit verschiedenen Fraktionierungsbereichen zur Verfügung. An ihnen hat sich der Benutzer anhand der Molekülgröße vorliegender Peptide zu orientieren und muß seine Säule daher mit jenem Gel beschicken, dessen Partikelgröße für die entsprechenden Molekulargewichte geeignet ist. Die hier synthetisierten Antigensequenzen haben folgende Molekulargewichte (in g):

Leserahmen	ohne Carrier	mit Carrier (-Gly-Gly-Lys-Di-PS)
BALF4 (266-278)	1563,90	2283,07
BALF4 (675-688)	1690,01	2409,18
BLLF1 (502-514)	1424,79	2143,96
BLLF1 (793-805)	1458,71	2177,88
BILF1 (123-135)	1452,85	2172,02
BILF2 (48- 60)	1507,90	2227,07

Tab. 6: Molekulargewichte der synthetisierten Antigenbereiche.

3.1.4.1 Gelfiltration

Sämtliche Reinigungen erfolgten mit dem Biogel P4 (Biorad), das einen Fraktionierungsbereich von 800-4000 D besitzt. Zur Anwendung wurde 1%ige Azetat-Lösung mit dem Biogel P4 im Verhältnis 5/1 versetzt. Konkret gibt man 175 ml 1%iges Azetat zu 35 g Biogel P4, kocht diese Lösung bis zu 90°C auf und entgast sie nach ihrer Abkühlung. Damit wurde eine Gelsäule von 50 cm Länge und 3 cm Durchmesser bis zu einer Standhöhe von 44 cm gefüllt, woraus ein Totalvolumen (V_t) von 311 cm³ entstand. Für ein sicheres Funktionieren waren einige Aspekte zu beachten:

Es durften keine Luftblasen in der Säule entstehen. Ein phasenweises Füllen der Säule war zu unterlassen und die Oberfläche mußte sofort mit 1%igem Azetat überschichtet werden, um ein Austrocknen und Reißen der Säule zu vermeiden. Außerdem sollte sich unter der luftdicht abschließenden Kappe auf der Säulenspitze ein Luftsog bilden, durch den die Elutionsflüssigkeit (1%iges Azetat) angezogen werden konnte. Um eine gleichmäßige Sedimentation zu gewährleisten, wurde

nach dem Beschicken der Säule sofort ein Durchfluß gestartet. Zur Stabilisierung des Gelbettes waren vor dem eigentlichen Gebrauch die Passagen von 2-3 Säulenvolumina erforderlich. Zusätzlich sollte anhand eines Probedurchlaufs mit gefärbten Substanzen die Homogenität des Gelbettes überprüft werden. Ein Trockenlaufen der Säule war stets zu vermeiden, denn es hätte das Filtrationsgel durch Rißbildungen unbrauchbar gemacht (PHARMACIA FINE CHEMICALS, 1979).

Die Flußrate U verhält sich zum Arbeitsdruck und Druckgefälle entlang der Gelsäule proportional. Für sie gilt folgende Beziehung: $U = (K \times \Delta p) : L$ (für K = Gelytpkonstante, Δp = Druckgefälle, L = Säulenlänge). Eine lange Säule und minimale Flußrate garantieren eine maximale Rückgewinnung des zu reinigenden Peptides. Die Flußrate sollte nicht über 10 cm/h liegen und wurde bei unserer Säule auf 8,3 cm/h mit einer Elutionsmenge von 30 ml/h eingestellt.

3.1.4.2 Erstellung einer Elutionskurve und "Eichgeraden"

Um die Funktionsweise einer Gelsäule besser verstehen zu können, wurde ihre Anordnung graphisch dargestellt (s. Abb. 11). Sie wurde durch 1%iges Azetat im Fließgleichgewicht gehalten. Bildet man den Quotienten aus Elutions- und Leervolumen (V_{el}/V_o) und zeichnet ihn auf der Abszisse gegen das logarithmische Molekulargewicht der eingesetzten Säulenproben auf der Ordinate ($\log MG$) ein, so ergibt sich eine sigmoidale Beziehung, um deren Wendepunkt sich eine "Eichgerade" mit einem beachtlichen Bereich einer annähernd linearen Beziehung zwischen V_{el}/V_o und $\log MG$ legen läßt. Dieser Bereich spiegelt als sog. Auswahlkurve den optimalen Arbeitsbereich eines bestimmten Gelytps wider (PHARMACIA FINE CHEMICALS, 1979). Um ihn für das Gel P4 zu ermitteln, war zunächst eine Elutionskurve zu erarbeiten. Dazu wurde ein Testproteingemisch aus folgenden Komponenten erstellt:

1. 5 mg Myosin (MG ca. 4.000)
2. 5 mg ACTH (MG ca. 3.500)
3. 5 mg Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂, MG 1.355,42)
4. 5 mg Glutathion (MG ca. 600).

Die Gesamtmenge von 20 mg wurde in 1 ml 1%igem Azetat aufgelöst und auf die Geloberfläche aufgetragen. Im Anschluß an einen Vorlauf von 75 ml fraktionierte man das Eluat in T-16-Röhrchen zu je 2 ml. So waren über fast 7 h 100 Einzelproben zu sammeln und die einzelnen Proteinbanden bei bekanntem Durchlaufvolumen zu testen. Die erhaltenen

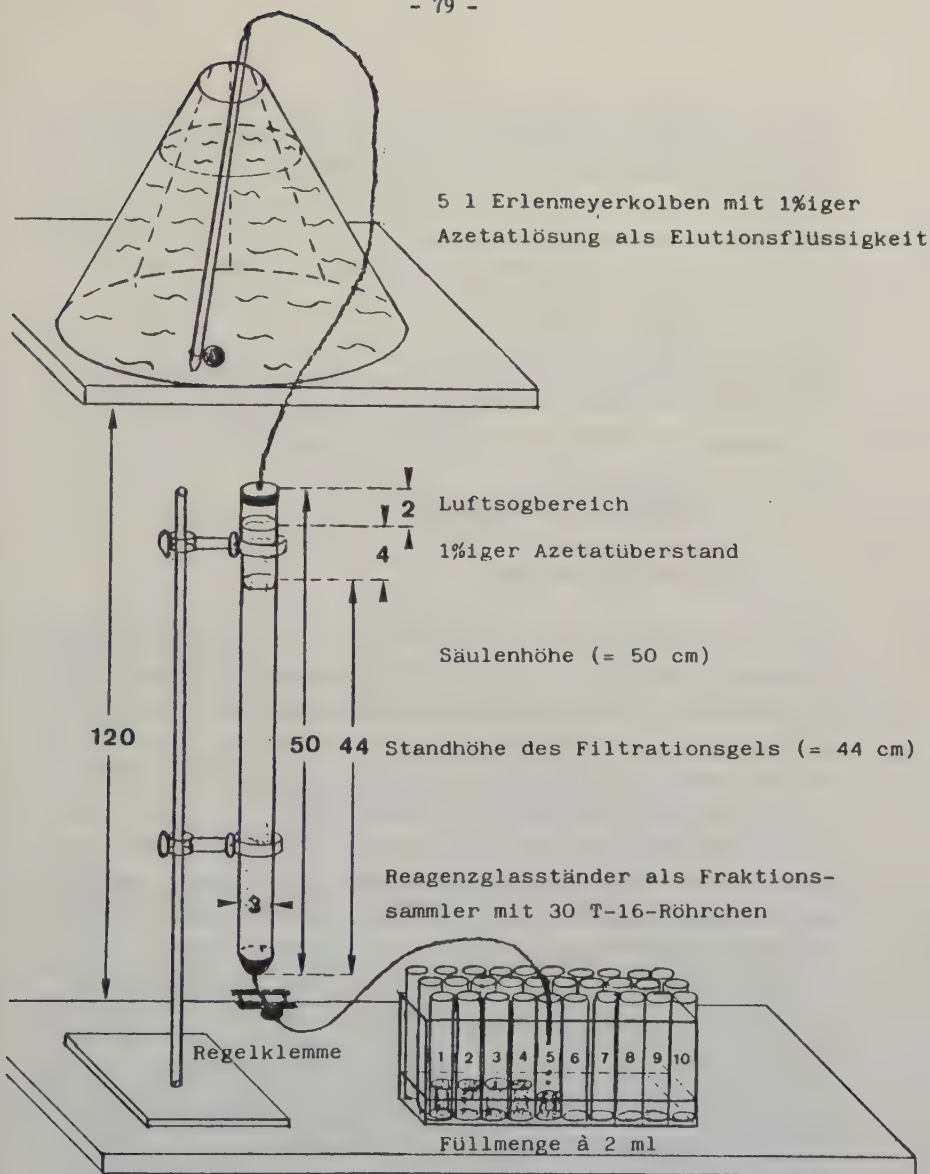


Abb. 11: Anordnung einer Gelfiltrationssäule zur Peptidreinigung. Die Säule ist in einem Stativ befestigt und bis zu einer Füllhöhe von 44 cm mit dem Biogel P4 (Biorad) bepackt.

Fractionen wurden im Spektralphotometer (Kontron Uvikon 860) bei 280 nm gemessen und aufgrund der zu- und abnehmenden optischen Dichte (OD) die Elutionsbereiche der 4 verschiedenen Komponenten festgestellt.

Beim ersten Peak der OD (hier Myosin) setzte man $V_{el}/V_o = 1$ und bestimmte bei bekanntem V_{el} gleichzeitig V_o . Damit konnte der Quotient V_{el}/V_o für alle übrigen Proben bestimmt werden. Bei den eingesetzten Bestandteilen des Testproteins wurde er auf der Abszisse gegen ihr logarithmisches MG (Ordinate) eingetragen und lieferte schließlich die gewünschte "Eichgerade". In unserem Fall zeigte sie im MG-Spektrum von 1.300-3.500 einen idealen Bereich. Damit war das ausgewählte Biogel P4 zur Reinigung der synthetisierten Peptide geeignet (MGs s. Tab. 6).

3.1.4.3 Reinigung der synthetisierten Peptide

3.1.4.3.1 Methodisches Vorgehen

Aufgrund der erarbeiteten "Eichgeraden" und der bekannten MGs der synthetisierten Peptide ließ sich jenes V_{el} berechnen, nach dessen Durchlauf die Auslösung der aufgetragenen Probe aus der Gelfiltrationssäule zu erwarten war. An diesem theoretisch ermittelten Wert orientierte man das jeweilige Vorlaufvolumen, das i.d.R. zwischen 50 bis 70 ml betrug und in einem Standzylinder aufgefangen wurde. Bei jedem zu reinigenden Peptid wurden dann insgesamt 90 Proben à 2 ml gesammelt, wobei jeweils die Hälfte vor und nach dem zu erwartenden V_{el} -Wert einzubringen war. Dieser großzügig festgelegte Bereich umfaßte stets das tatsächliche Elutionsvolumen und soll an einem Beispiel erläutert werden:

$V_{el} = 140 \text{ ml} \Rightarrow \text{Vorlauf} = 140 - (45 \times 2) \text{ ml} = 50 \text{ ml}$ und Einzelprobenspektrum = 51.-230.ml, wobei der 51.-52.ml dem T-16-Gläschen Nr. 1 und der 229.-230.ml dem der Nr. 90 entsprechen würden.

Bei der Reinigung wurde das jeweilige Peptid (insgesamt 12 verschiedene Gruppen) mit bzw. ohne Carrier von 6 unterschiedlichen Antigenbereichen in einer Menge von maximal 50 mg in 1 ml 50%iger Essigsäure aufgelöst, was durch leichte Erwärmung beschleunigt werden konnte. Nötigenfalls wurde konzentrierte Essigsäure hinzugegeben, bis sich das Peptid hinreichend gelöst hatte. Dann wurde die Probe auf die Gelsäule aufgetragen und in Einzelfractionen eluiert.

Die Identifizierung und Rückgewinnung der gereinigten Peptide aus den verschiedenen Reagenzgläsern erfolgte im Gegensatz zum Testgemisch durch 2 verschiedene Farbreaktionen: die Ninhydrin- oder Coomassie-

Blau-Färbung. Sobald die Peptid-haltigen Proben ermittelt waren, wurden sie in Rundkolben gesammelt, in flüssigem N₂ eingefroren und unter der Lyophile bei 2-4°C ca. 48-72 h gefriergetrocknet. Durch ein erneutes Wiegen der Gefäße konnte schließlich das Gewicht der gereinigten Peptide bestimmt werden.

In der geschilderten Weise wurden alle synthetisierten Antigenbereiche gereinigt, wobei ca. 80% von den in Tab. 7 angegebenen Rohgewichten zurückzugewinnen waren. Die Gelsäule wurde über Nacht mit 600 bis 700 ml Essigsäure (1%) gewaschen. Sie war somit gereinigt und für den nächsten Arbeitsgang gebrauchsfertig.

Leserahmen	mit Carrier	ohne Carrier
BALF4 (266-278)	19 mg	146 mg
BALF4 (675-688)	22 mg	218 mg
BLLF1 (502-514)	25 mg	140 mg
BLLF1 (793-805)	81 mg	145 mg
BILF1 (123-135)	24 mg	104 mg
BILF2 (48- 60)	12 mg	123 mg

Tab. 7: Rohgewichte (mg) synthetisierter Peptide für die Reinigung mittels Gelfiltration nach der HF-Abspaltung.

3.1.4.3.2 Ninhydrinfärbung nach der Gelfiltration

Auf Whatman 3MM Filterpapier wurde für jede Probe ein Quadrat mit 2 cm Kantenlänge eingezeichnet und nummeriert. Anschließend spottete man diese Flächen mit 20 µl der entsprechenden Elutionsproben und ließ sie an der Luft trocknen. Schließlich wurde mit einem Ninhydrinspray (0,1% zur Chromatographie) das gesamte Filterpapier eingesprüht und zur Trocknung unter den Abzug gelegt. Daraufhin wurde das Papier für ca. 5 min. in einen Heizschrank mit 105°C gebracht. Peptidhaltige Spots färbten sich blau, und durch eine optische Beurteilung ließen sich die zur Lyophilisation vorgesehenen Fraktionen auswählen (s. Abb. 12).

Allerdings können mit dieser Methode nur Peptide nachgewiesen werden, die eine AS mit einer freien Aminogruppe in ihrer Kette haben. Außer für die NH₂-Termine trifft dies lediglich beim Lys zu. Aus diesen Gründen reagierten nur BALF4 (675-688) u. BLLF1 (502-514) bei der Ninhydrinprobe positiv, da sie beide ein Lys in ihrer Sequenz aufwei-

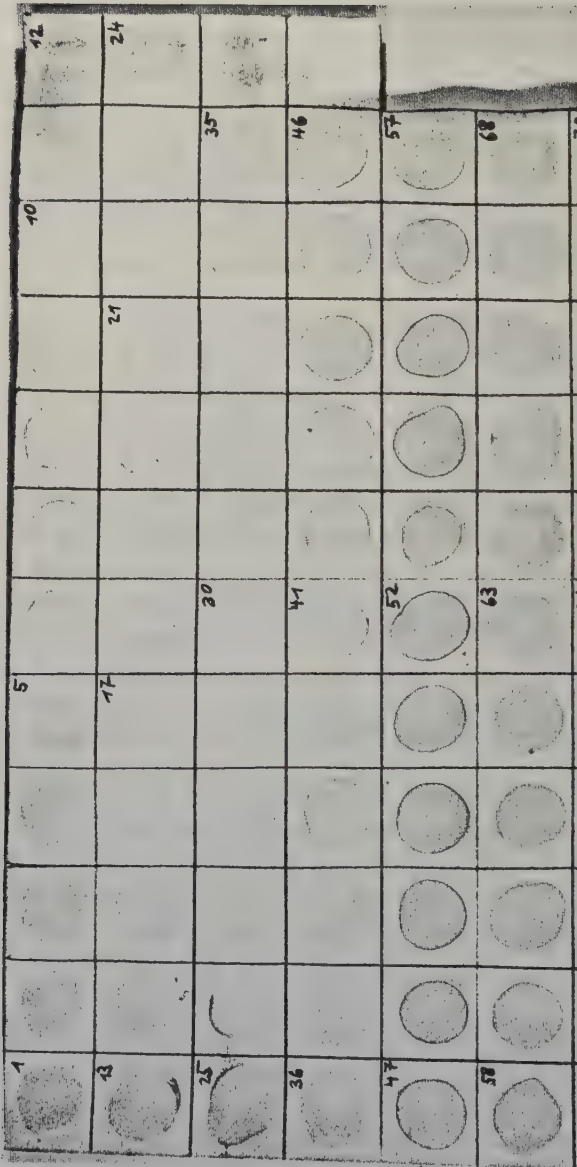


Abb. 12: Ninhydrinfärbung nach der Reinigung von BALF 4 (675-688). Die Proben Nr. 36-57 wurden als reine und die von 58-68 als unreine Form ausgewählt. Näheres zu dieser Färbemethode wurde unter 3.1.4.3.2 beschrieben.

sen. Dagegen können die NH_2 -Gruppen des α, ϵ -Lys', welches mit Di-PS verestert ist, keine positive Ninhydrinreaktion bei dem erläuterten Färbetest erwirken. Alle anderen Peptidfraktionen, die keine Reaktion auf Ninhydrin zeigten, mußten mit der Coomassie-Blau-Färbung nachgewiesen werden.

3.1.4.3.3 Coomassie-Blau-Färbung nach der Gelfiltration

In gleicher Weise wie bei der Ninhydrinfärbung wurden die vorgezeichneten Quadrate eines Whatman 3MM Filterpapiers mit je 20 μl der vorliegenden Elutionsproben gespottet und an der Luft getrocknet. Da sich bei einigen Tests die Färbung mit dieser Peptidmenge als sehr schwach erwies, wurde in den meisten Fällen der obige Vorgang nochmals wiederholt und insgesamt mit 40 μl /Quadrat markiert. Das Papier kam für 10 min. in eine Wanne mit 10%igem TCA. Anschließend wurde es entnommen und 2mal für je 1/2 min. in Ethanol gewaschen. Die Färbung mit 10 mg Coomassie Brilliant Blue pro ml 7%iger Essigsäure dauerte bei 60°C 10 min. Nach dieser Zeit erfolgte die Entfärbung über 30 min. in 7%iger Essigsäure (ebenfalls bei 60°C). Dabei sollte die Azetatlösung jeweils im Abstand von 5 min. erneuert werden, um die Entfärbung zu beschleunigen.

Peptidhaltige Spots erschienen dunkelblau und ihre entsprechenden Fraktionen wurden nach dem gleichen Prinzip gepoolt und lyophilisiert wie unter 3.1.4.3.1 beschrieben wurde (s. Abb. 13).

3.1.5 Immunisierung von Kaninchen mit den synthetisierten Peptiden

In Anlehnung an HOPP (1981), HOPP und WOODS (1981), PRINCE et al. (1982) und HOPP (1984) können kurzkettige Peptidantigene durch Koppelung an Trägerproteine oder Fettsäuren zur Immunisierung verwendet werden. HOPP (1984) erhöhte den immunogenen Charakter eines synthetischen HBsAg-Peptides durch dessen kovalente Bindung an Fettsäureanteile.

Zur Gewinnung von Antisera wurden im Handsynthese-Verfahren die AS Gly, Gly und Lys kovalent an das Aminoende der hergestellten Antigene gebunden und beide NH_2 -Gruppen des Lys' mit PS verestert. Nach der Reinigung dieser Peptide mit Carrier-Gruppe wurden jeweils 5 mg entnommen, mit 5 ml sterilem A. dest. versetzt und als gebrauchsfertige Lösungen eingefroren. Bei Bedarf entnahm man für eine Einzelapplika-

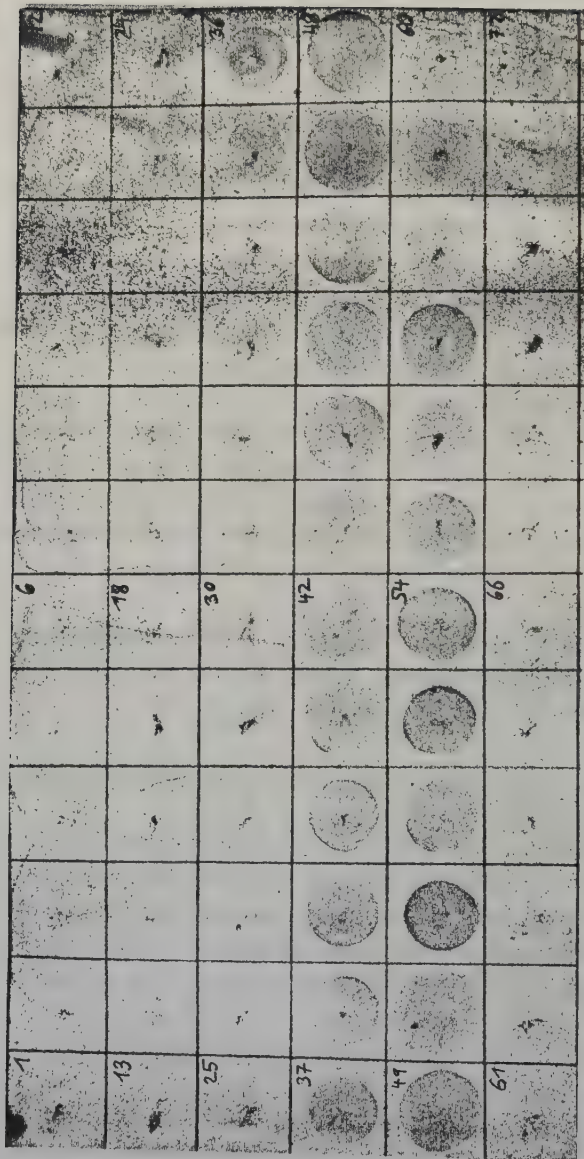


Abb. 13: Coomassie-Blau-Färbung nach der Reinigung von BILF 1 (123-135). Die Proben Nr. 25-42 wurden als reine und die von 43-60 als unreine Form ausgewählt. Näheres zu dieser Färbemethode wurde unter 3.1.4.3.3 beschrieben.

tion 0,5 ml aus einer der 6 Lösungen und vermischte sie mit der gleichen Menge an Freund'schem Adjuvans (Behring). Diese beiden Komponenten wurden zunächst getrennt in jeweils einer 1 ml-Spritze aufgezogen, ihre Coni gegeneinander gerichtet und mit einem passenden Plastikstückchen fest zusammengesteckt. Durch ein schnelles Hin- und Herbewegen der Stempel über ca. 30 Sekunden ergab sich eine fein emulgierte, weiße Injektionslösung. In dieser Weise war vor jeder individuellen Verabreichung zu verfahren. Diese Emulsion wurde in einer Menge von insgesamt 1 ml an mindestens 2 - besser 4 - Stellen entlang des Musculus longissimus dorsi subkutan gespritzt.

Jedes Antigen wurde in 2 Hasen inokuliert. Vor der ersten Applikation mit komplettem Freund'schen Adjuvans (10 mg Mycobacterium tuberculosis humanum, hitzeabgetötet und getrocknet + 1,5 ml Mannit-Monooleat + 8,5 ml Draceol als leichtes Mineralöl) erfolgte bei allen Kaninchen eine Blutentnahme (à ca. 5 ml aus der Vena auricularis) zur Negativkontrolle. Daraufhin schlossen sich 4 Boosterungen mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (1,5 ml Mannit-Monooleat + 8,5 ml Draceol als leichtes Mineralöl) im 3-Wochen-Intervall an. Eine Woche nach der 2. Auffrischungsimpfung wurde eine erneute Blutentnahme (ca. 5 ml pro Einzeltier) quasi als 1. Positivkontrolle durchgeführt. 10 Tage nach der 4. Boosterung wurden die Kaninchen narkotisiert und zur Gewinnung des Finalserums als 2. Positivkontrolle entblutet.

Zur Anästhesie eignet sich Nembutal^R (Ceva), das 60 mg Pentobarbital-Natrium pro ml enthält. Es führt über eine Zerebraldepression zur tiefen Narkose mit gut ausgeprägtem Toleranzstadium. Bei einer Dosierung von 30 mg/kg i.v. tritt die Wirkung prompt ein. Die erste Hälfte der erforderlichen Dosis wurde binnen 20 Sekunden injiziert, die zweite unter Beachtung des Kornealreflexes fraktioniert verabreicht. Sobald dieser vermindert war oder eine Atemdepression eintrat, wurde die Injektion sofort eingestellt. Im Bereich des 3. bis 5. Interkostalraumes oder parasternal schob man einen intrakardialen Katheter (Ventrikelbereich) und konnte auf diese Weise ca. 100-150 ml Blut pro Kaninchen gewinnen.

Sämtliche Blutproben kamen nach ihrer Entnahme für einige Stunden in den Kühltank. Sie wurden anschließend bei 2500 r/min. zentrifugiert (Hettich Rotixa/KS), das Serum wurde abpipettiert. Diesen Vorgang wiederholte man 1-2mal, das reine Serum wurde bei -20°C aufbewahrt. Die gewonnenen Tierseren wurden zur Titerbestimmung mit ihren entsprechenden EBV-Peptiden in ELISAs eingesetzt. Außerdem wurden sie

zur Identifikation EBV-viraler Proteine im Western Blotting, in der Immunpräzipitation und -fluoreszenz verwendet.

Das Freund'sche Adjuvans (Behring) soll vor allem bei gelösten Antigenen zur Verstärkung der immunisierenden Wirkung im Tierversuch indiziert sein. Seine komplette Form unterscheidet sich von der inkompletten ausschließlich durch die zusätzliche Komponente an *Mycobacterium tuberculosis* und hat dadurch einen größeren Effekt. Dieser Bestandteil führte - mit einer einzigen Ausnahme - zu subkutanen Abszessen ($\varnothing$ 3-4 cm) an der Injektionsstelle, die zu 40 % sogar aufbrachen. Sie heilten binnen 3-4 Wochen spontan ab, und die Kaninchen zeigten in dieser Phase einen erhöhten Wasserbedarf und ein leicht apathisches Verhalten. Eine palpatorische Untersuchung konnte nach den Boosterungen mit inkomplettem Adjuvans keinerlei Abszesse eruieren. In jedem Fall ließen sich hochtitrige Antiseren (1:20.000 - 1:100.000) gegen die spezifischen Peptide erzielen.

3.1.6 ELISA-Tests mit den synthetisierten Peptiden

Um über den diagnostischen Wert der hergestellten Antigenbereiche eine Aussage treffen zu können, wurden 4 verschiedene Gruppen von Humanseren ($\approx$ 93) ausgewählt, und ihr Gehalt an IgA, IgG und IgM wurde im ELISA gegen die einzelnen Peptide getestet. Die Seren setzte man in einer Verdünnung von 1/50 ein, worauf in der IgG-Reihe bei 5 von 6 verwendeten Antigensequenzen eine große Anzahl von Seren mit ihrer OD über dem maximalen Meßbereich (2,6) lag. Deshalb wurden in dieser Reihe bei 4 Antigenen die ELISAs mit 3 verschiedenen Serengruppen in einer Verdünnung von 1/200 wiederholt (s. Ergebnisse).

Anhand der Werte des obigen Untersuchungsblocks wählte man aus der Gruppe der NPC-Patienten 6 und aus derjenigen der EBV-Negativen 2 Seren aus und prüfte sie in geometrischen Verdünnungsreihen von 1/10 bis 1/10.240 auf IgA, IgG und IgM gegen die hergestellten Peptide.

Schließlich waren noch die AK-Titer der Kaninchenserum in ELISAs gegen ihre entsprechenden Antigene mit Hilfe geometrischer Verdünnungsreihen zu ermitteln. Bei den EBV-negativen Ausgangsseren wurden Verdünnungsstufen von 1/10 bis 1/320, bei den ersten Positivkontrollen (nach der 2. Boosterung) von 1/10 bis 1/10.240 und bei den zweiten Positivkontrollen (nach der 4. Boosterung) von 1/80 bis 1/81.920 angelegt.

Somit lassen sich die vorgenommenen ELISA-Tests in 3 Kategorien einordnen:

1. Testreihen mit 4 Gruppen von Humanseren und Darstellung ihrer OD-Werte in Verteilungsdiagrammen
2. Geometrische Verdünnungsreihen 8 verschiedener Humanseren (6 NPC-Patienten + 2 EBV-Negative) und Wiedergabe ihrer ODs als Polygone
3. Geometrische Verdünnungsreihen bei Kaninchenseren (12 x 3) und Darlegung ihrer ODs als Kurvenzüge in 6 Einzeldiagrammen.

Die Versuchsdurchführung basierte stets auf dem gleichen Grundprinzip. In die Näpfe einer Titrationsplatte (Dynatech) wurde immer dieselbe Menge eines bestimmten Peptids in gelöster Form einpipettiert.

3.1.6.1 Methodisches Vorgehen beim Durchführen eines ELISAs

Den erwähnten ELISAs liegt im technischen Ablauf stets dasselbe Schema zugrunde. Es wurden lediglich verschiedene AK oder Verdünnungsstufen bzw. -reihen bei bestimmten Serengruppen verwendet.

Von den ausgewählten Humangruppen waren 2 Sets anzulegen, wobei die einen 1/50 und die anderen 1/200 mit PBS + 0,5% Tween 20 + 2% Hammelserum verdünnt wurden. Das Gesamtvolumen der jeweiligen Verdünnungsreihen betrug 1 ml. In jeden Napf einer Mikrotiterplatte (Dynatech) gab man 20 µg des gewünschten Peptids, das in 50 µl 0,2M Na-Carbonatpuffer mit pH 9,5 und 0,15M NaCl gelöst war. Die Platten kamen in eine feuchte Kammer und wurden über Nacht zur Bindung der Peptide an die Plastiknäpfe bei 37°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Platte 3mal mit PBS + 0,5% Tween 20 gewaschen (Dynatech Miniwash). Nach dem Einpipettieren von 200 µl Gelatinelösung (5 mg Schweinehautgelatine/ml A. dest., Sigma) und 2% Hammelserum pro Napf wurde zur Absättigung 1 h in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden 2mal mit PBS + 0,5% Tween 20 gewaschen, 50 µl Antiserumverdünnung (1/50 verdünnt mit PBS + 0,5% Tween 20 + 2% Hammelserum) pro Napf zugegeben und 2 h in einer feuchten Kammer (37°C) inkubiert.

Bei den geometrischen Reihen wurden 100 µl mit der gewünschten Startverdünnung in den Ausgangsnäpfen vorgelegt. In die folgenden Positionen einer Serie kamen lediglich 50 µl Lösungsmittel (PBS + 0,5% Tween 20 + 2% Hammelserum). Daraufhin pipettierte man jeweils unter sorgfältigem Mischen 50 µl aus Position 1 nach 2 und von dort fortlau-

fend nach X und verwarf schließlich 50 µl aus der letzten Position einer Verdünnungsreihe.

Die Näpfe wurden mit dem Dynatech Miniwash abgesaugt und 3mal mit PBS + 0,5% Tween 20 bei einer Zwischenwartezeit von jeweils 2 min. gewaschen. In jeden Napf gab man 100 µl Peroxidase-konjugierte AK (rabbit anti human IgG, rabbit anti human IgM, goat anti human IgA oder goat anti rabbit IgG, 1/200 verdünnt mit PBS + 0,5% Tween 20 + 2% Hammelserum; Dakopatts u. Bio-Rad) und inkubierte abermals für 2 h in einer feuchten Kammer (37°C).

Danach wurde - wie oben - die Lösung abgesaugt und die Platte 3mal mit PBS + 0,5% Tween 20 gewaschen (Zwischenwartezeit 2 min.). Schließlich wurden in jeden Napf 100 µl einer Färbelösung gegeben (pro Platte 10 ml 0,1M Na-Phosphatpuffer mit pH 6,0 + 10 mg ortho-Phenylendiamin + 10 µl H₂O₂) und mit der Platte zur Inkubation 10 min. in eine dunkle Kammer gestellt. Hernach stoppte man die Farbreaktion mit 100 µl 2M H₂SO₄/Well.

Die optische Dichte der Näpfe wurde im Spektralphotometer (Kontron SLT 210) bei 486 nm bestimmt und ausgedruckt. Als Lichtquelle diente eine Quarz-Halogen-Lampe (Osram), und die Meßzeit betrug 50 Sekunden pro Platte.

3.1.6.2 Auswahlkriterien verschiedener Gruppen von Humanserem

	VCA-IgA	VCA-IgG	VCA-IgM	EA-IgA	EA-IgG	EBNA	PBT
EBV-Negative ($\leq$ 21 Jahre)	-	-	-	-	-	-	-
NPC-Patienten	$\geq$ 1:16	$\geq$ 1:16	Ø o. -	$\geq$ 1:16	$\geq$ 1:16	+	Ø o. -
Frische EBV-Infektionen	-	+	+	-	+/-	-	+
Abgelaufene EBV-Infektionen	-	+	-	-	-	+	-

Tab. 8: Auswahlkriterien 4 verschiedener Gruppen von Humanserem des Testzeitraums 1983-1986 aus dem Pool des Max von Pettenkofer-Instituts (+ $\hat{=}$ positivem Titer; - $\hat{=}$ negativem Titer; Ø $\hat{=}$ einem nicht getesteten Titer; Titerangaben nur bei NPC-Patienten als Untergrenze des Auswahlpektrums).

In den Eingangsbüchern der Serologischen Diagnostik des Max von Pettenkofer-Instituts sind standardmäßig 7 Rubriken mit verschiedenen Untersuchungskriterien ausgewiesen. Anhand dieser Aufzeichnungen konnten 4 verschiedene Gruppen von Humansen (à 93) des Testzeitraums 1983-1986 ausgewählt werden; diesbezügliche Kriterien sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

3.1.6.3 Anzahl eingesetzter Seren und Titrationsplatten in den verschiedenen Untersuchungsreihen des ELISAs

Bei sämtlichen ELISAs kamen Dynatech-Platten mit je 96 Näpfen zum Einsatz; sie sind horizontal mit 1-12 und vertikal mit A-H gekennzeichnet. Die ausgewählten Humansen wurden auf IgA-, IgG- und IgM-spezifische Antikörper untersucht. Dabei wurde von den 4 ausgewählten Standardgruppen entweder der volle (Nr. 1-93) oder halbe Serensatz (Nr. 1-46) verwendet. Dementsprechend belegte man eine ganze Titrationsplatte mit 3 bzw. eine halbe mit 2 Leerwerten. Um eine repräsentative Vergleichsmöglichkeit zu haben, mußten zur Halbierung der Gesamtzahl einer Standardgruppe stets die gleichen Serennummern herangezogen werden. Bei der 1/50-Verdünnungsreihe entstanden insgesamt 57 Platten, wobei auf ein Peptid 9,5 entfielen.

	IgA	IgG	IgM
EBV-Negative	0,5	1	0,5
NPC-Patienten	1	1	0,5
Frische EBV-Infektionen	1	1	1
Abgelaufene EBV-Infektionen	0,5	1	0,5

Tab. 9: Angelegte Mikrotiterplatten pro Peptid
in der Verdünnungsreihe 1/50.

Die geometrischen Verdünnungsreihen mit 8 Humansen (6 NPC-Patienten + 2 EBV-Negative) wurden auf Titer der IgA-, IgG- und IgM-Klassen gegen die einzelnen Peptide getestet (Verdünnung 1/10 bis 1/10.240) und jeweils mit einem Leerwert pro Serum versehen.

In der Verdünnungsstufe 1/200 waren - wie bereits erwähnt - 4 Peptide getestet worden und erforderten zusammen 10 Platten.

	EBV-Negative	NPC-Patienten	Frische EBV-Infektionen
IgG gegen BALF ₄ (266-278)	0,5	1	1
IgG gegen BALF ₄ (675-688)	0,5	1	1
IgG gegen BLLF ₁ (502-514)	0,5	1	1
IgG gegen BILF ₁ (123-135)	0,5	1	1

Tab. 10: Gesamtzahl angelegter Titerplatten bei der Verdünnungsstufe 1/200 mit IgG als zweitem Antikörper.

3.1.7 SDS-Gelelektrophorese

Mit Hilfe 10 EBV-spezifischer Zellextrakte sollte versucht werden, sämtliche Kaninchenseren nach der 4. Boosterung in Western Blots zu analysieren. Um einen negativen Vergleichswert zu besitzen, mußte diese Testreihe zunächst bei den negativen Ausgangsseren durchgeführt werden. Zur Testung der Peptide des BLLF₁-Leserahmens wurden 10%ige, ansonsten jedoch 12%ige Gele gegossen. Außerdem sollte geprüft werden, ob die anti-Peptidseren anhand von Immunpräzipitaten zu identifizieren sind.

3.1.7.1 Western Blotting mit anti-Peptidseren

Die Methode des Western Blottings läßt sich in 3 Abschnitte gliedern: das Gießen eines Gels, das Elektroblotten von Proteinen und die Inkubation des Blots mit einem spezifischen Antiserum bzw. Antikörper.

3.1.7.1.1 Verfahrensweise beim Gießen eines Gels

Zwei Glasplatten (20x15 cm) wurden an ihren Seiten durch 2 Spacer getrennt und in eine Gelapparatur senkrecht eingespannt. Die Abdichtung an der Unter- und den beiden Seitenkanten geschah mit erhitzter 1%iger Agarlösung (s. Tab. 11). Anschließend war das Trenngel herzustellen. Die Bestandteile Sol. C, Sol. A, Wasser und AMPER (Bio-Rad) wurden zusammengefügt und entgast. Danach wurden SDS (20%) und TEMED (Bio-Rad) zugegeben (s. Tab. 11). Diese Lösung wurde bis zu einem Stand von ca. 3 cm unterhalb der Oberkante in den Glaszwischenraum pipettiert und sofort mit Wasser überschichtet. Nach 2-3 h war das SDS-PAG polymerisiert. Die Wasserschicht wurde abgegossen und die

Glasplatten wurden in der Apparatur erneut fixiert, so daß der Einschnitt der Oberkante diesmal nach hinten gerichtet war. Die Gelkammern wurden korrekt positioniert und die untere wurde zur Hälfte mit Elektrodenpuffer gefüllt. Der Gelkamm (22 Zähne) war so weit zwischen die Glasplatten zu schieben, bis seine Zähne noch ca. 1 cm vom Trenngel entfernt lagen. Nun wurde das Sammelgel (Tab. 11) bis zur Glasoberkante einpipettiert und das Entstehen von Luftblasen sorgfältig vermieden. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 1 h konnte der Kamm entfernt und auch die obere Kammer mit Elektrodenpuffer bis zu einer Standhöhe von etwa 1,5 cm über der Sammelgelgrenze gefüllt werden.

Agar (1%ig): 2g Agar + 75ml 1M Tris pH 8,5 + 125ml A. dest. + 1ml SDS

AMPER: 140 mg AMPER (Bio-Rad) + 10 ml A. dest.

Boiling mix: 0,03M Tris pH 7,0 + 3% SDS + 20% Saccharose + 5% Mercaptoethanol + Bromphenolblau

Elektrodenpuffer: (72 g Glycin + 15 g Tris-Base + 25 ml 20%iges SDS) pro 5 l A. dest.

Sammelgel (2 Gele): 8,2 ml A. dest. + 1,5 ml Sol. D + 1,7 ml Sol. C + 0,6 ml AMPER + 6,0 µl TEMED (Bio-Rad)

Sol. A (1M Tris): 12,1 g Tris-HCl pH 8,5 + 100 ml A. dest.

Sol. C: 28 g Acrylamid (Bio-Rad) + 0,73 g DATD (Bio-Rad) + 100 ml H₂O

Sol. D: 19,2 ml 1M Tris-HCl pH 7,0 + 0,8 ml SDS (20%)

Trenngel (2 Gele):

10%ig: 13,92 ml Sol. C + 15 ml Sol. A + 9,9 ml A. dest. + 1 ml AMPER + 0,2 ml SDS (20%) + 12,5 µl TEMED (Bio-Rad)

12%ig: 17,4 ml Sol. C + 15 ml Sol. A + 6,4 ml A. dest. + 1 ml AMPER + 0,2 ml SDS (20%) + 12,5 µl TEMED (Bio-Rad)

Tab. 11: Lösungskomponenten für die SDS-PAGE.

Die durch den Kamm präformierten Taschen wurden mit den aufzutragenden Proben unterschichtet, da sich in ihnen bereits Pufferlösung aus der oberen Kammer befand. In der Mitte des Gels wurde 2mal die gleiche Standardproteineinmischung (à 10 µl) zugesetzt. Je 40 µl der 10 verschiedenen Zellextrakte wurden aufgetragen, die Taschen 1-10 bzw. 13-22 in der gleichen Abfolge belegt und damit 2 identische Gelhälften (s. Abb. 15) geschaffen. Dadurch bestand die Möglichkeit, das gleiche Gel für 2 verschiedene Seren vorzusehen. Auch wenn das Gel vor oder nach dem Blotten nicht stets exakt in der Mitte zu trennen war,

betrifft eine geringfügige Abweichung von der medianen Trennlinie lediglich die Markerslots.

Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur mit 8 mA/Gel über Nacht durchgeführt und beendet, sobald die Bromphenolblau-Bande der aufgetragenen Proben das Gelende an der unteren Glaskante erreicht hatte. Damit war das SDS-PAG für das Blotting verfügbar.

3.1.7.1.2 Technik des ElektrobloTTings von Proteinen

Nach der Abtrennung der Sammelgelzone wurde das SDS-PAG in ElektrobloTTingpuffer gelegt (s. Tab. 12). Die BloTTing-Apparatur wurde nach dem gleichen Prinzip aufgebaut, wie es MODROW (1983) beschrieb. Allerdings lassen sich auch 2 Gele übereinander bloTTen, falls man die für ein Gel vorgesehenen Einbettungsschichten wiederholt und durch ein Dialysepapier voneinander trennt. Diese Anordnung eines oder zweier Gele wird unten und oben von jeweils einer leitfähigen Schaumstofflage und Kohleplatte abgeschlossen (s. Abb. 14).

Die in einem Gel aufgetrennten Proteinproben wurden elektrophoretisch auf Nitrozellulose-Papier (Schleicher & Schüll, Ø der Poren 0,45 µm) transferiert und dort gebunden. Die BloTTapparat ist folgendermaßen aufgebaut:

2 Kohleplatten (25x15x2 cm³) bilden den "Außenmantel". In der Mitte einer Längsseite ist oben der etwa 3 cm hohe Kathoden- und unten der ca. 6 cm hohe Anodenanschluß eingelassen. Beide sind mit Platindraht als Elektrodenkontakt versehen. Sämtliche Schichten zwischen den Kohleplatten sind vor ihrem Einlegen mit BloTTingpuffer gründlich zu durchtränken und luftblasenfrei aufzulegen. Es folgen von unten beginnend: Anodenplatte, Schaumstoffschwamm (25x15x1 cm³), Whatman 3MM Filterpapier, Nitrozellulosepapier, SDS-PAG (Nr. 1), Whatman 3MM Filterpapier, Dialysepapier, Whatman 3MM Filterpapier, Nitrozellulosepapier, SDS-PAG (Nr. 2), Whatman 3MM Filterpapier, Schaumstoffschwamm (25x15x1 cm³) und Kathodenplatte. Bei nur einem Gel würden ab dem Dialysepapier 5 Schichten entfallen und die Anordnung müßte nach oben hin mit der Schwammlage und Kathodenplatte abschließen. Um eine optimale Verbindung zwischen den einzelnen Lagen zu gewährleisten, wird die obere Kohleplatte während der gesamten BloTTzeit (4 h) mit einem Gewicht von 2-3 kg beschwert. Die Apparatur steht in einer Wanne, die man bis zur unteren Schwammlage mit BloTTingpuffer gefüllt hat. Die Elektroden sind mit einem Batterieladegerät verbunden, das auf eine Stromstärke I von 1 A ($\hat{=}$ 3 mA/cm² bei einer Spannung U von 28-30 V) einzustellen ist.

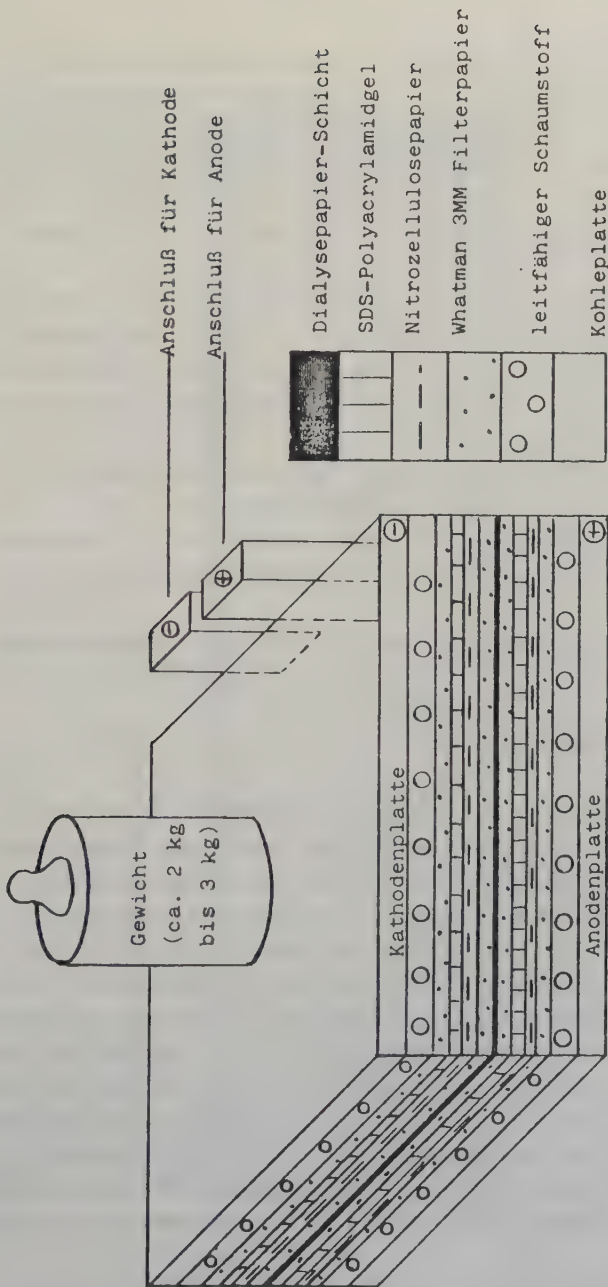


Abb. 14: Schematischer Aufbau einer Blotting-Apparatur mit 2 Gelen zur Übertragung von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosepapiere bei einer Stromstärke I von einem Ampere ($\approx 3 \text{ mA/cm}^2$ bei einer Spannung U von 28-30 Volt).

Cohen-Puffer: 1 mg/ml Ficoll 400 + 1 mg/ml Polyvinylpyrrolidon +
16 mg/ml Rinderserumalbumin + 0,1% Nonidet-P40 + 0,05% Gelatine +
170 mM Borat + 150 mM NaCl

DAB-Färbelösung: 100 mg DAB (3,3'-Diaminobenzidin) + 10 ml 1M Tris pH
7,5 + 190 ml A. dest. + 70 µl H₂O₂

Elektroblottingpuffer: 72 g Glycin + 15 g Tris-Base + 1 l Methanol +
4 l A. dest.

Gelatinepuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (≙ 50 ml 1M Tris/l A. dest.) +
5 mM Na₂-EDTA (≙ 50 ml 0,1M Na₂-EDTA/l A. dest.) + 150 mM NaCl (≙
30 ml 5M NaCl/l A. dest.) + 0,25% Gelatine (≙ 2,5 g Gelatine/l H₂O)
+ 0,5% Triton-X-100 (≙ 5 ml Triton-X-100/l A. dest.) + 0,1% SDS (≙
5 ml 20%igem SDS/l A. dest.)

TBS-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,4 (≙ 10 ml Tris-Stammlösung/l; 1,211 g
Tris/l ≙ 10 mM Tris) + 154 mM NaCl (≙ 8,999 g/l)

TTBS: 20 mM Tris pH 7,5 + 500 mM NaCl + 0,05% Tween 20 ≙ (100 ml 1M
Tris pH 7,5 + 146,1 g NaCl + 2,5 ml Tween 20)/5 l A. dest.

Tab. 12: Zusammensetzung von Lösungen im Rahmen des Elektroblottings.

3.1.7.1.3 Inkubation des Blots

Nach dem Blotten wurde das Nitrozellulosepapier in Cohen-Puffer (s. Tab. 12) für ca. 1 h unter Schütteln inkubiert. Durch diesen Puffer können Protein-freie Stellen abgesättigt werden. Die abgesättigte Nitrozellulose wurde über Nacht mit dem jeweiligen Kaninchenserum (1/50 verdünnt mit TBS, s. Tab. 12) bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein 6maliges Waschen mit Gelatinepuffer oder TTBS im 15-Minuten-Intervall. In einem Gesamtvolumen von 20-30 ml wurde der 2. AK (goat anti rabbit IgG, 1/500 verdünnt mit TBS und Peroxidase-konjugiert) aufgetragen und für 2 h inkubiert. Im Anschluß daran mußte erneut - wie vor der Inkubation - 6mal in 15minütigen Abständen gewaschen werden. Die Färbung des Nitrozellulosepapiers geschah mit DAB unter Sichtkontrolle und ließ sich nach Abgießen des Färbestoffes durch Wasser stoppen. Der Blot (s. Abb. 15) wurde an der Luft getrocknet.

Bei sämtlichen Blots mit Kontrollseren nach der 4. Boosterung (n=12) konnten im Vergleich zu den Negativkontrollen (n=12) keine spezifischen Banden der verabreichten Peptide nachgewiesen werden. Daher

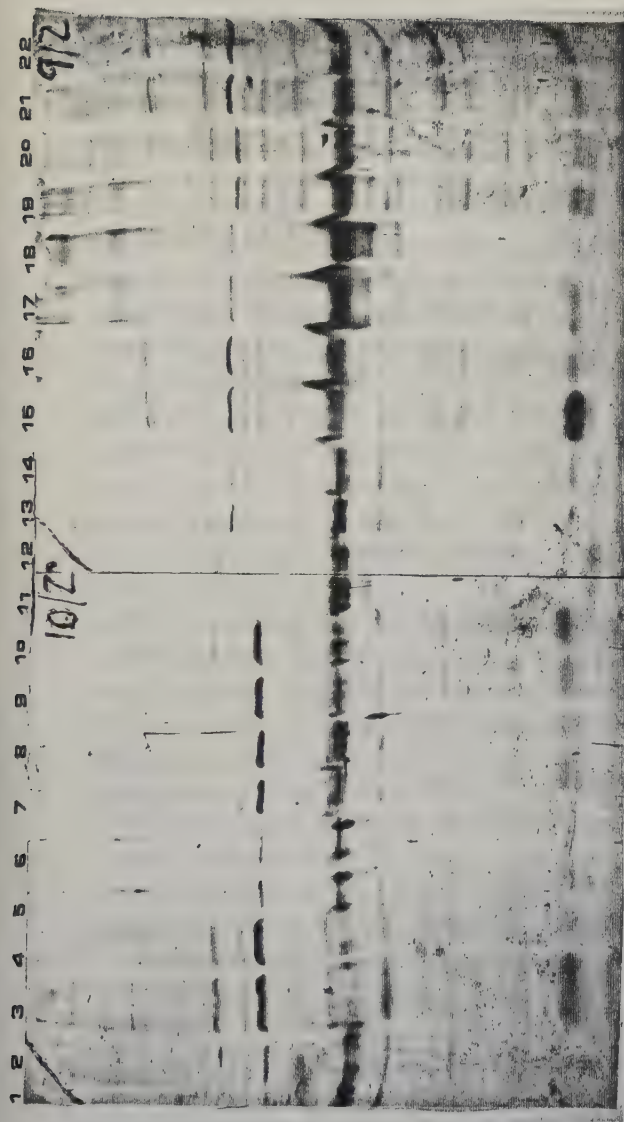


Abb. 15: Western Blot mit 2 Hälften identischer Proteinproben. Sie wurden mit den zweiten Kontrollseren (nach der 4. Boosterung) des gleichen Peptides aus dem Leserahmen BALF 4 (266-278) inkubiert. Die Bezeichnungen 9/2 oder 10/2 bedeuten: zweite Kontrollseren der Kaninchen Nr. 9 resp. 10. Die einzelnen Slots stammen aus folgenden Zellextrakten:
Nr. 1+13: BJAB; Nr. 2+14: induzierte BJAB; Nr. 3+15: Raji; Nr. 4+16: induzierte Raji; Nr. 5+17: P₃HR-1; Nr. 6+18: induzierte P₃HR-1; Nr. 7+19: B95-8; Nr. 8+20: induzierte B95-8; Nr. 9+21: superinfizierte Raji-12; Nr. 10+22: superinfizierte Raji-24; Nr. 11+12: Proteinmarker.

wurden einige Blots nochmals wiederholt und nach ihrer Inkubation mit Kaninchenserum (4 Boosterungen) mit einem Monoklonalen-Überstand versehen. Das übrige Vorgehen gestaltete sich wie oben. Allerdings wurden die Blots zum einen mit Peroxidase-konjugierten AKs (goat anti rabbit IgG, 1/500 verdünnt mit TBS), zum anderen mit Phosphatase-konjugierten AKs (goat anti rabbit IgG, 1/500 verdünnt mit TBS) inkubiert. Auch diese Gegenüberstellung hatte ein negatives Ergebnis.

Bei den Phosphatase-konjugierten AKs mußte das Nitrozellulosepapier mit NBT und BCIP gefärbt werden. Dazu fertigte man einen Carbonat-Puffer an ($0,1\text{M NaHCO}_3 + 1,0\text{ mM MgCl}_2$) und stellte ihn mit NaOH auf pH 9,8 ein. Anschließend wurden in einer 70%igen DMF-Lösung 30 mg NBT/ml und in einer 100%igen DMF-Lösung 15 mg BCIP/ml gelöst. Kurz vor dem Gebrauch waren 1 ml der NBT- und 1 ml der BCIP-Stammlösung in 100 ml des obigen Carbonat-Puffers zu geben. Mit dieser Gesamtlösung ließen sich die Blotbanden unter Sichtkontrolle anfärben. Diese Reaktion wurde ebenfalls mit Wasser gestoppt.

3.1.7.2 Immunpräzipitation mit anti-Peptidseren

BJAB- und B95-8-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium (Gibco) gezüchtet, mit TPA (40 ng) und Buttersäure (3 mM) induziert und 24 h danach für weitere 4 h mit ^{35}S -Met markiert. Nach der Markierung wurden die Zellen gewaschen, in Immunpräzipitationspuffer ($0,5\%$ Nonidet P-40 + 20 mM Tris-HCl pH 9,0 + 300 mM NaCl + 1 mM CaCl_2 + 0,5 mM MgCl_2 + 2 mM EDTA + 10% Glyzerin) suspendiert und durch Beschallen lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert und die Überstände mit 10 μl positivem Kaninchenserum per 10^6 Zellen inkubiert. Die Seren hatte man zuvor mit einem Extrakt EBV-negativer BJAB-Zellen präadsorbiert. Es wurden 3 mg Protein A-Sepharose (Pharmacia) hinzugefügt, und die gebundenen Immunkomplexe wurden pelletiert, gewaschen und einer SDS-PAGE unterzogen.

3.1.8 Immunfluoreszenztest mit anti-Peptidseren

EBV-positive (B95-8) und EBV-negative Zelllinien (BJAB) wurden durch Zentrifugation angereichert und mit TPA (40 ng) und Buttersäure (3 mM) induziert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgetragen (4 μl Zellen pro Feld) und anschließend getrocknet. Ihre Fixation erfolgte mit Azeton über 5-10 min. im Kühlschrank. Sie lassen sich bei -20°C aufbewahren und nach Bedarf einsetzen.

In 3 Verdünnungsstufen (1/10, 1/50 und 1/100) wurden die Kaninchen-seren mit einem BJAB/PBS-Extrakt präadsorbiert und auf die einzelnen Felder der Objektträger gebracht (20 µl Serum/Feld). Dabei erwies sich der Verdünnungsgrad 1/50 bei relativ wenig Hintergrund-Reaktionen als der geeignetste. Er wurde nach einigen Vorversuchen sämtlichen IF-Tests zugrunde gelegt. Dagegen zeigte die IF in den Verdünnungsstufen 1/100 nur noch eine sehr schwache Ausprägung.

Die Zellextrakte auf den Objektträgern wurden über 1 h in einer feuchten Kammer (37°C) mit den verdünnten Seren inkubiert. Anschließend waren sie 15 min. in kaltem PBS-Puffer zu waschen, wobei die Lösung 2-3mal gewechselt werden sollte. Nach dem Waschen waren die Objektträger abzuklopfen und die Stege zu trocknen. Pro Feld wurden 20 µl FITC-konjugierte AK (swine anti rabbit IgG, 1/50 verdünnt mit PBS) aufgetragen und zur Inkubation 1 h in eine feuchte Kammer (37°C) gestellt. Hinterher wurde - wie oben - 15 min. mit PBS gewaschen. Die Zellausstriche waren durch Deckgläser, die in Elvanol eingebettet wurden, zu schützen und im Kühlschrank zu lagern.

Die Analyse des Testes erfolgt am besten sofort, da die IF-Intensität bereits nach Tagen nachläßt und dann eine Beurteilung verzerrt oder gar verhindert. Die verschiedenen Serenproben wurden im UV-Licht unter einem Mikroskop (Zeiss-Mikroskop III RS) betrachtet und z.T. fotografiert (s. Ergebnisteil). Die Präadsorption der Seren ermöglichte eine Reduzierung der Hintergrund-Reaktionen und damit eine objektivere Auswertung der IF-Teste.

3.2 ERGEBNISSE

3.2.1 Resultate der Peptidsynthesen

Die ausgewählten Peptidsequenzen wurden im vollautomatisierten 430 A Peptidsynthesizer (Applied Biosystems) hergestellt. Mit dem Handsynthese-Gerät (Peninsula) war an etwa 1/3 der synthetisierten Rohpeptide (d.h. vor der HF-Abspaltung und Reinigung) ein Carrier (-Gly-Gly-Lys-Di-PS) für die Inokulation der Kaninchen angekoppelt worden.

Mit Hilfe obiger Herstellungstechniken wurden die nachfolgenden Rohgewichte einzelner Peptide gewonnen.

	mit Carrier (-Gly-Gly-Lys-Di-PS)	ohne Carrier
BALF4 (266-278)	0,40 g	0,72 g
BALF4 (675-688)	0,44 g	0,77 g
BLLF1 (502-514)	0,48 g	0,78 g
BLLF1 (793-805)	0,32 g	0,60 g
BILF1 (123-135)	0,45 g	0,80 g
BILF2 (48- 60)	0,45 g	0,79 g

Tab. 13: Rohgewichte synthetisierter Peptide (g) vor der HF-Abspaltung und Reinigung.

3.2.2 Gewichtsverluste der synthetisierten Peptide bei der HF-Abspaltung und Reinigung mittels Gelfiltration

Aus den Tabellen 7 und 13 sind die Rohgewichte der hergestellten Peptide nach und vor der HF-Abspaltung ersichtlich. Durch die Abtrennung des Harzes und der Seitenketten-Schutzgruppen ist der tatsächliche Verlust der Rohsubstanz schwierig zu berechnen, doch dürfte ein beachtlicher Prozentsatz auf eine zu rasche Öffnung der Absperrventile 3 bis 5 zurückzuführen sein (s. Abb. 10). Dadurch kann ein Teil der in den Reaktionsgefäßen gelösten Peptide in den Adsorptionszylinder abgesaugt worden und irreversibel verloren gegangen sein.

Im Verlauf der Peptidreinigung kamen nochmals 15-20% von den Rohgewichten nach der HF-Abspaltung abhanden. Davon läßt sich ein erheblicher Teil vor allem durch unvollständiges Lösen, aber auch Hantieren mit verschiedenen Gefäßen (T-16-Gläschen → Gelsäule → Fraktionsgläser → Rundkolben zur Gefriertrocknung) erklären. Andererseits wurden

zur Identifizierung der Einzelfraktionen kleine Peptidmengen beim Spotten des Whatman 3MM Filterpapiers benötigt. Außerdem konnten Randzonen aus dem positiven Spektrum der Ninhydrin- bzw. Coomassie-Blau-Färbung (Abb. 12 u. 13) mitunter schlecht erfaßt oder abgegrenzt werden. Ein allzu großzügiges Selektieren der Fraktionen aus dem Randbereich einer positiven Färbung birgt wiederum die Gefahr einer erneuten Verunreinigung in sich. Schließlich könnte zugunsten einer maximalen Rückgewinnung verschiedener Peptidproben aus der Gelfiltrationssäule noch eine weitere Reduzierung der Flußrate in Betracht gezogen werden.

3.2.3 Erzielte Antikörpertiter nach 4facher Boosterung von Kaninchen mit synthetischen EBV-Peptiden

Bei allen Kaninchen ließen sich durch die Immunisierung hochtitrige Antiseren gegen die spezifischen Peptide gewinnen. Sie lagen nach der 4. Boosterung in einem Bereich von 1:20.000 (BILF2, 48-60) bis 1:100.000 (BALF4, 675-688). Mit Ausnahme von 2 Peptiden (BILF1, 123-135 und BALF4, 266-278) konnten die AK-Titer zwischen der 2. und 4. Auffrischungsimpfung noch um 1-3 Titrationsstufen gesteigert werden. Allerdings lagen sie bei BALF4 (266-278) und BLLF1 (502-514) nach der 2. Boosterung (erste Kontrollseren) bereits erstaunlich hoch.

Die Negativ- sowie die ersten (nach 2 Boosterungen) und zweiten (nach 4 Boosterungen) Kontrollseren wiesen bei 5 Peptiden unter den jeweiligen Tierpaaren einen annähernd parallelen Titerverlauf auf. Lediglich in der Gruppe BILF2 (48-60) zeigte das Kaninchen Nr. 8 eine bemerkenswerte Abweichung von diesem Befund: zum einen stellte dieses Tier die einzige Ausnahme dar, bei der nach der Inokulation mit komplettem Freund'schen Adjuvans keinerlei Abszesse auftraten, zum anderen belegten die Polygone nach der 2. und 4. Boosterung einen nahezu gleichartigen Verlauf; das bedeutet, daß in diesem Fall der AK-Titer durch die 3. und 4. Auffrischungsimpfung im Vergleich zur 2. in keiner Weise erhöht werden konnte. Während der gesamten Versuchsperiode zeichnete sich das Kaninchen Nr. 8 vor allen übrigen durch eine besondere Widerstandsfähigkeit und Vitalität aus.

Betrachtet man im Rahmen der 2. Kontrollseren (nach 4 Boosterungen) unter der jeweiligen Peptidgruppe die Reaktionsintensität der einzelnen Tiere, so ergibt sich hinsichtlich abnehmender Antititer folgende Rangordnung:

BALF4 (675-688) → BALF4 (266-278) → BLLF1 (502-514) →

BLLF1 (793-805) → BILF1 (123-135) → BILF2 (48-60).

Dabei bilden die ersten 3 die "Ober-", BLLF1 (793-805) die "Mittel-" und die beiden letzten die "Unterstufe". Es ist auffällig, daß gerade bei jenen Peptiden, die noch nicht definitiv als Membranantigene deklariert werden konnten, die niedrigsten AK-Titer aufzuweisen waren.

Bei den 2. Kontrollseren wurden die ELISA-Platten fotografiert. Horizontal sind die geometrischen Verdünnungsreihen von 1:80 bis 1:81.920 für die 12 Tiere untereinander angelegt. Die Position 12 stellt einen Leerwert mit IgG als zweitem AK dar. In der Aufnahme sind durch Lichtreflexe die Farbintensitäten einzelner Wells geringgradig verzerrt (Abb. 16); dies darf die spektralphotometrisch ermittelten ODs nicht in Frage stellen. Die Abb. 17 zeigt sämtliche ELISA-Tests mit Kaninchenseren im Verdünnungsbereich 1:80 bis 1:81.920.

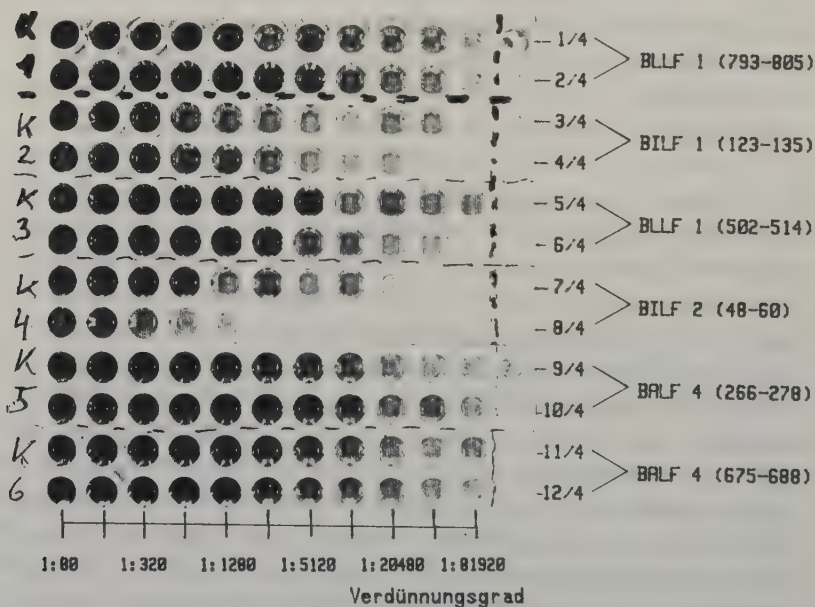


Abb. 16: ELISA mit den 2. Kontrollseren der Kaninchen (4 Boosterungen). Horizontal werden die geometrischen Verdünnungsreihen von 1/80 bis 1/81.920 incl. Leerwert in Position 12 dargestellt. Vertikal sind 12 verschiedene Seren in den entsprechenden Verdünnungsgraden angeordnet. Am rechten Bildrand gibt die Ziffer vor dem Querstrich die Tiernummer wieder, die dahinter verdeutlicht die Anzahl der vorgenommenen Boosterungen.

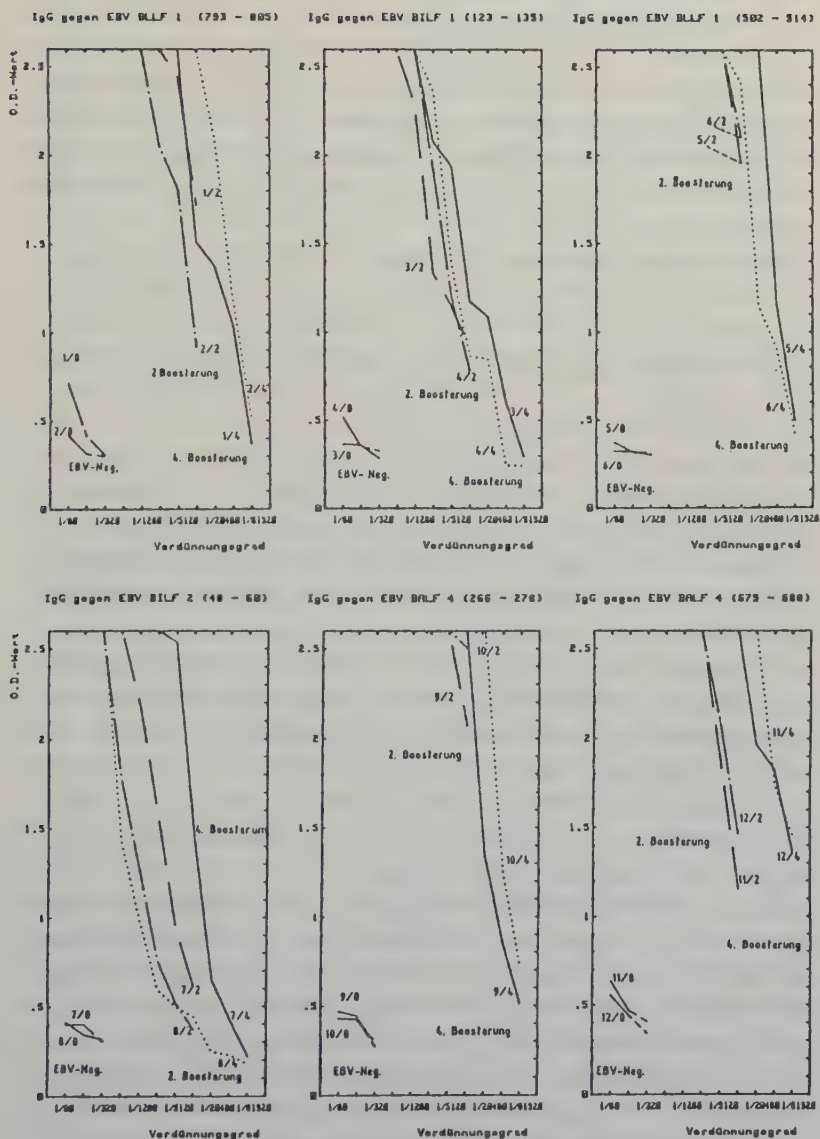


Abb. 17: Geometrische Verdünnungsreihen (1/80 bis 1/81.920) bei EBV-positiven Kaninchenserum sowie entsprechenden EBV-negativen Ausgangsseren. Die Ziffern an den Polygonen haben folgende Bedeutung: Tiernummer/Anzahl der durchgeführten Boosterungen.

3.2.4 Bestimmung von IgA-, IgG- und IgM-Titern in Humanseren gegen EBV-Peptide mittels ELISA-Test

Obwohl sämtliche ELISAs nach der gleichen Methode durchgeführt wurden, kann von keiner Standardisierung ausgegangen werden, da wegen der hohen Empfindlichkeit des angewandten Verfahrens Schwankungen nicht auszuschließen waren. Diese Tatsache ist bei der Interpretation stets zu berücksichtigen.

Die ELISAs mit Humanseren lassen sich in 2 Kategorien aufgliedern und demgemäß wiedergeben:

3.2.4.1 Testreihen mit 4 Gruppen von Humanseren und Darstellung ihrer OD-Werte

Die aus diesen Serien gewonnenen ODs wurden als Mittelwerte ($\bar{m}$) und Standardabweichungen (s) incl. Standardfehlern (s_m) unter den entsprechenden Patientengruppen tabellarisch aufgeführt (Tab. 14-17). Es ist zu betonen, daß alle Werte ≥ 2.6 in die Berechnung der 3 Parameter ($\bar{m}$, s , s_m) mit 2.6 als Konstante eingingen, so daß aufgrund eines begrenzten Meßbereichs des Spektralphotometers eine gewisse Fehlerquelle nicht auszuschließen war (RIEDWYL, 1978). Zusätzlich wurden sämtliche Einzelwerte aus dieser Rubrik in Verteilungsdiagrammen (Abb. 18-21) veranschaulicht und den betreffenden Tabellen gegenübergestellt.

Daraus ergeben sich folgende Konsequenzen:

Einerseits ermöglichen die Tabellen - für jedes Peptid getrennt - eine Interpretation der ELISA-Werte aus den verschiedenen Patientengruppen. Um für ein spezifisches Antigen eine positive Aussage hinsichtlich seines diagnostischen Wertes machen zu können, müssen die Seren der NPC-Patienten bzw. frisch Infizierten mit ihren ODs die der EBV-Negativen aus der entsprechenden Peptidgruppe um mindestens das 2,1fache übertreffen (WOLF, persönliche Mitteilung). Andererseits wird durch die Verteilungsdiagramme die Streubreite der Einzelseren in den diversen Antigenblöcken ersichtlich. Gegebenenfalls ist ein Überlappungsbereich der Standardabweichungen unter den eingesetzten Patientengruppen eines bestimmten Peptids zu erkennen. Außerdem werden bei den Serenverdünnungen von 1/50 und 1/200 sowie den verschiedenen Igs unterschiedliche Reaktionsmuster offenbar.

3.2.4.1.1 IgA-Reihe

Die Betrachtung des IgA-Blocks (Tab. 14 u. Abb. 18) zeigt, daß bei sämtlichen Peptiden entweder die NPC-Patienten oder die frisch Infizierten den höchsten $\bar{m}$ zu verzeichnen haben. Die Antigene aus dem Lysat BALF4 reagierten beachtlich stärker als die übrigen; jedoch lagen hier auch die Mittelwerte der EBV-Negativen eindeutig höher. Im wesentlichen sind 3 Ergebnisse aus der IgA-Gruppe interessant:

1. Bei BLLF1 liegen die Mittelwerte der frisch Infizierten um mehr als das 2,1fache über denen der EBV-Negativen. Allerdings überschneiden sich $\pm s$ in einem sehr großen Bereich.
2. Die NPC-Patienten zeigen mit BILF1 (123-135) eine OD, die um mehr als das 2,1fache über der der EBV-Negativen lokalisiert ist. Außerdem überlappen sich $\pm s$ kaum.
3. Die Karzinom-Patienten und frisch Infizierten übertreffen bei BALF4 (675-688) deutlich die ODs der EBV-Negativen. Zwischen $\pm s$ besteht für die NPC-Patienten und EBV-Negativen noch eine hinreichende Diskrepanz. Der diagnostische Nutzen dieses Antigens kann unter den zugrundeliegenden Bedingungen (Serenverdünnung 1/50 bei IgA gegen BALF4, 675-688) zur Diskussion gestellt werden.

Generell übersteigen die Meßwerte der abgelaufenen Infektionen im IgA-Block die der EBV-Negativen um weniger als das Doppelte. Die IgA-Reihe weist insgesamt höhere ODs auf als die IgM-Serie, dennoch wesentlich niedrigere als die IgG-Klasse in der entsprechenden Verdünnung (1/50).

3.2.4.1.2 IgG-Reihe

Für den IgG-Block (Tab. 15 u. Abb. 19) sind in der Verdünnung 1/50 4 Ergebnisse wichtig:

1. Die Antigene BILF1 (793-805), BALF4 (266-278) und BALF4 (675-688) liegen mit vielen Seren außerhalb des Meßbereichs (23%, 26% und 27%). Auch bei BILF1 (123-135) und BLLF1 (502-514) sind die Overflows nicht unbedeutend (16% und 6%), während sie bei BILF2 (48-60) kaum ins Gewicht fallen (2%).
2. Für BILF1 (123-135) zeichnen sich im Hinblick auf $\bar{m} \pm s$ bei der Karzinomgruppe und den frischen Infektionen wesentliche Unterschiede zu den EBV-Negativen ab, wobei sich $\pm s$ zwischen den frisch infizierten und den negativen Patientenserum nur mäßig überlappen.

Peptidgruppe	Patientengruppe	$\bar{m}$	s	s _m
BLLF1 (793-805)	EBV-Negative	0.367	0.363	0.054
BLLF1 (793-805)	NPC-Patienten	0.514	0.252	0.026
BLLF1 (793-805)	FrISChe Infektionen	0.776	0.498	0.052
BLLF1 (793-805)	Abgelaufene Infektionen	0.454	0.367	0.054
BILF1 (123-135)	EBV-Negative	0.197	0.166	0.024
BILF1 (123-135)	NPC-Patienten	0.688	0.346	0.036
BILF1 (123-135)	FrISChe Infektionen	0.350	0.239	0.025
BILF1 (123-135)	Abgelaufene Infektionen	0.247	0.224	0.033
BLLF1 (502-514)	EBV-Negative	0.440	0.245	0.036
BLLF1 (502-514)	NPC-Patienten	0.810	0.359	0.037
BLLF1 (502-514)	FrISChe Infektionen	0.647	0.434	0.045
BLLF1 (502-514)	Abgelaufene Infektionen	0.659	0.408	0.060
BILF2 (48- 60)	EBV-Negative	0.385	0.178	0.026
BILF2 (48- 60)	NPC-Patienten	0.626	0.286	0.030
BILF2 (48- 60)	FrISChe Infektionen	0.622	0.517	0.054
BILF2 (48- 60)	Abgelaufene Infektionen	0.516	0.397	0.059
BALF4 (266-278)	EBV-Negative	0.947	0.481	0.071
BALF4 (266-278)	NPC-Patienten	1.637	0.515	0.053
BALF4 (266-278)	FrISChe Infektionen	1.778	0.705	0.073
BALF4 (266-278)	Abgelaufene Infektionen	1.615	0.707	0.104
BALF4 (675-688)	EBV-Negative	0.650	0.382	0.056
BALF4 (675-688)	NPC-Patienten	2.052	0.480	0.050
BALF4 (675-688)	FrISChe Infektionen	1.513	0.744	0.077
BALF4 (675-688)	Abgelaufene Infektionen	1.167	0.584	0.086

Tab. 14: Mittelwerte ($\bar{m}$), Standardabweichungen (s) und Standardfehler (s_m) bei Verteilungsdiagrammen von OD-Werten in verschiedenen Gruppen ausgewählter Humanseren (Verdünnung 1/50). IgA wurde als AK gegen die einzelnen Peptide getestet. Die Seren der 4 Patientengruppen wurden beim ELISA in folgenden Mengen eingesetzt: EBV-Negative (n=46), NPC-Patienten (n=93), frISChe Infektionen (n=93) und abgelaufene Infektionen (n=46). Die Berechnung der dargestellten Parameter erfolgte nach RIEDWYL (1978). $\bar{m} \pm s$ werden in Abb. 18 unter den entsprechenden Patientengruppen als Säulendiagramme wiedergegeben.

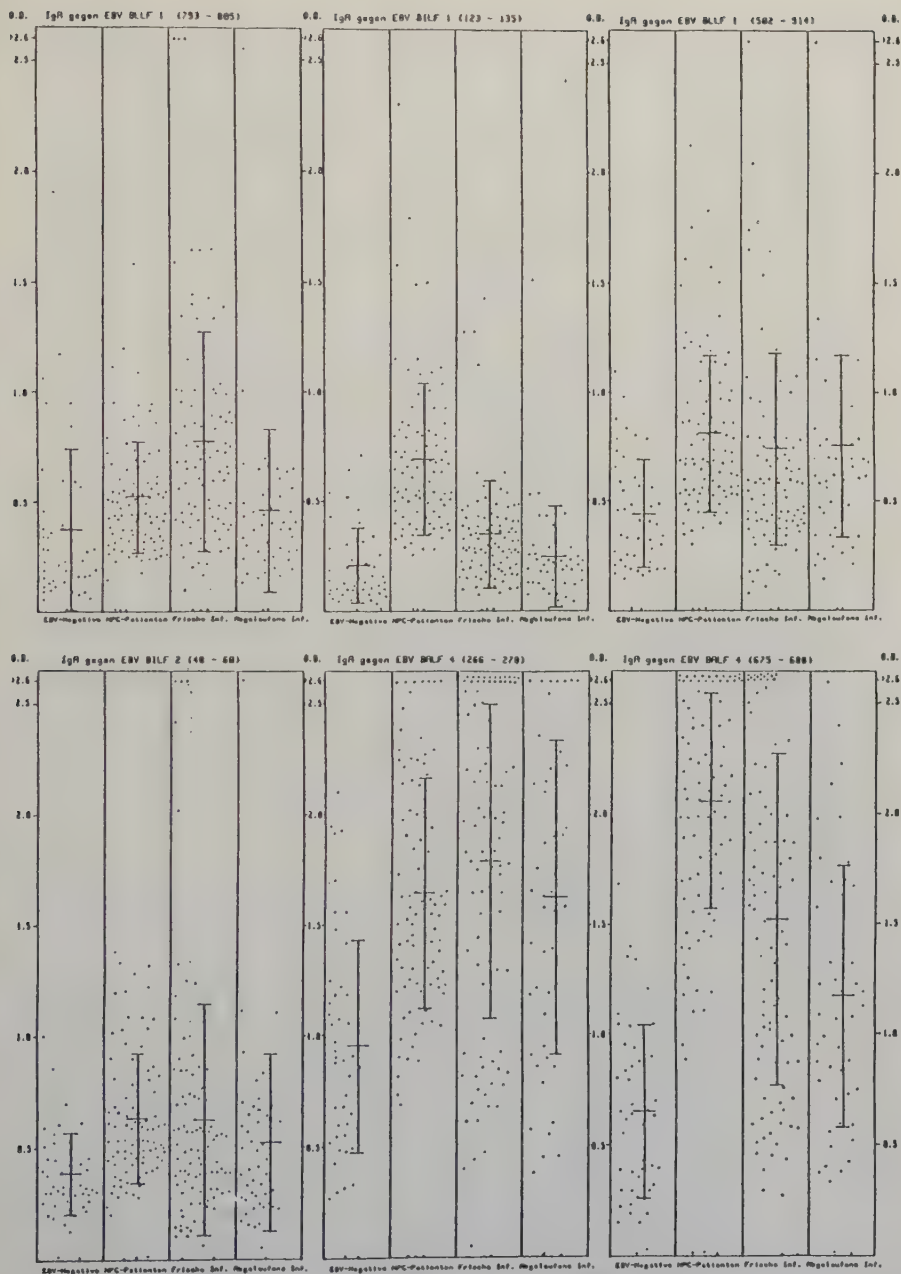


Abb. 18: Verteilungsdiagramme von OD-Werten in verschiedenen Gruppen von Humanseren (Verdünnung 1/50) beim Einsatz von IgA gegen spezifische EBV-Peptide. $\bar{m}$ und $\pm s$ sind als Säulendiagramme eingezeichnet.

Peptidgruppe	Patientengruppe	$\bar{m}$	s	s_m
BLLF1 (793-805)	EBV-Negative	1.566	0.642	0.084
BLLF1 (793-805)	NPC-Patienten	1.970	0.528	0.055
BLLF1 (793-805)	FrISChe Infektionen	2.111	0.583	0.060
BLLF1 (793-805)	Abgelaufene Infektionen	1.749	0.652	0.068
BILF1 (123-135)	EBV-Negative	0.586	0.384	0.051
BILF1 (123-135)	NPC-Patienten	2.146	0.551	0.057
BILF1 (123-135)	FrISChe Infektionen	1.433	0.598	0.062
BILF1 (123-135)	Abgelaufene Infektionen	0.758	0.476	0.050
BLLF1 (502-514)	EBV-Negative	1.178	0.603	0.079
BLLF1 (502-514)	NPC-Patienten	1.478	0.518	0.054
BLLF1 (502-514)	FrISChe Infektionen	1.592	0.651	0.067
BLLF1 (502-514)	Abgelaufene Infektionen	1.165	0.509	0.053
BILF2 (48- 60)	EBV-Negative	0.516	0.238	0.031
BILF2 (48- 60)	NPC-Patienten	0.970	0.540	0.059
BILF2 (48- 60)	FrISChe Infektionen	1.244	0.607	0.063
BILF2 (48- 60)	Abgelaufene Infektionen	0.737	0.441	0.046
BALF4 (266-278)	EBV-Negative	1.790	1.035	0.136
BALF4 (266-278)	NPC-Patienten	1.845	0.687	0.071
BALF4 (266-278)	FrISChe Infektionen	1.847	0.722	0.075
BALF4 (266-278)	Abgelaufene Infektionen	1.956	0.580	0.060
BALF4 (675-688)	EBV-Negative	1.590	0.564	0.074
BALF4 (675-688)	NPC-Patienten	1.861	0.712	0.074
BALF4 (675-688)	FrISChe Infektionen	2.422	0.348	0.036
BALF4 (675-688)	Abgelaufene Infektionen	1.797	0.438	0.045

Tab. 15: Mittelwerte ($\bar{m}$), Standardabweichungen (s) und Standardfehler (s_m) bei Verteilungsdiagrammen von OD-Werten in verschiedenen Gruppen ausgewählter Humansenen (Verdünnung 1/50). IgG wurde als AK gegen die einzelnen Peptide getestet. Die Seren der 4 Patientengruppen wurden beim ELISA in folgenden Mengen eingesetzt: EBV-Negative (n=93), NPC-Patienten (n=93), frISChe Infektionen (n=93) und abgelaufene Infektionen (n=93). Die Berechnung der dargestellten Parameter erfolgte nach RIEDWYL (1978). $\bar{m} \pm s$ werden in Abb. 19 unter den entsprechenden Patientengruppen als Säulendiagramme wiedergegeben.

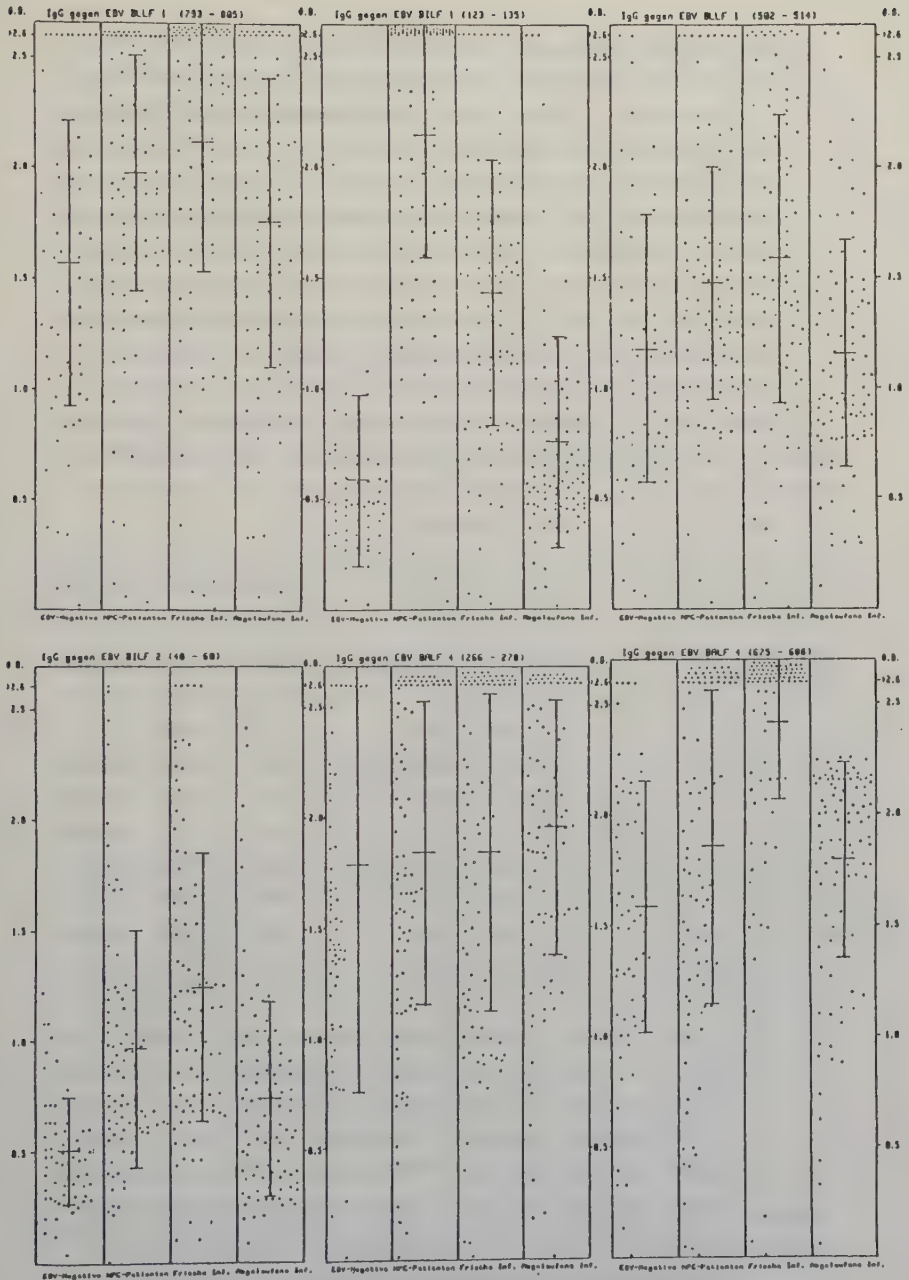


Abb. 19: Verteilungsdiagramme von OD-Werten in verschiedenen Gruppen von Human-seren (Verdünnung 1/50) beim Einsatz von IgG gegen spezifische EBV-Peptide. $\bar{m}$ und $\pm s$ sind als Säulendiagramme eingezeichnet.

3. Eine deutliche Diskrepanz präsentiert BILF2 (48-60) mit den Mittelwerten aus der Gruppe der Negativen und frisch Infizierten. $\pm$ s überschneiden sich nur innerhalb der ODs von 0.637-0.754; daraus resultiert ein gemeinsames Spektrum von 0.117.
4. Beim Test mit BALF4 (675-688) zeigen 70% der frisch Infizierten einen Overshoot. Diese Seren gingen mit jeweils 2.6 in die Mittelwertberechnung ein. Wenn auch der Durchschnittswert dieser Gruppe um weniger als das Doppelte über dem der negativen Patientengruppe liegt, ist eine konkrete Aussage über den diagnostischen Einsatz dieses Antigens nur in einer höheren Serenverdünnung (s. unten) möglich.

Die Seren von NPC- und IM-Patienten zeigten im Vergleich zur Negativgruppe gegen jedes Peptid einen erhöhten Titer. Die 2 höchsten Mit-

Peptidgruppe	Patientengruppe	$\bar{m}$	s	s_m
BILF1 (123-135)	EBV-Negative	0.682	0.257	0.038
BILF1 (123-135)	NPC-Patienten	0.952	0.311	0.032
BILF1 (123-135)	FrISChe Infektionen	1.053	0.425	0.044
BLLF1 (502-514)	EBV-Negative	0.671	0.303	0.045
BLLF1 (502-514)	NPC-Patienten	1.518	0.354	0.037
BLLF1 (502-514)	FrISChe Infektionen	1.421	0.475	0.049
BALF4 (266-278)	EBV-Negative	0.678	0.419	0.062
BALF4 (266-278)	NPC-Patienten	1.253	0.510	0.053
BALF4 (266-278)	FrISChe Infektionen	1.515	0.546	0.057
BALF4 (675-688)	EBV-Negative	0.684	0.369	0.054
BALF4 (675-688)	NPC-Patienten	1.286	0.485	0.050
BALF4 (675-688)	FrISChe Infektionen	1.412	0.551	0.057

Tab. 16: Mittelwerte ($\bar{m}$), Standardabweichungen (s) und Standardfehler (s_m) bei Verteilungsdiagrammen von OD-Werten in verschiedenen Gruppen ausgewählter Humansenen (Verdünnung 1/200). IgG wurde als AK gegen die einzelnen Peptide getestet. Die Seren der 3 Patientengruppen wurden beim ELISA in folgenden Mengen eingesetzt: EBV-Negative (n=46), NPC-Patienten (n=93) und frISChe Infektionen (n=93). Die Berechnung der dargestellten Parameter erfolgte nach RIEDWYL (1978). $\bar{m} \pm s$ werden in Abb. 20 unter den entsprechenden Patientengruppen als Säulendiagramme wiedergegeben.

telwerte hatten in dieser IgG-Reihe (Verdünnung 1/50) BILF1 (123-135) bei der Karzinomgruppe (2.146) und BALF4 (675-688) bei den IM-Patienten (2.422) zu verzeichnen.

Aufgrund der unter 3.1.6 genannten Gründe wurden die ELISAs der IgG-Reihe bei 4 von 6 Antigenen in einer Serenverdünnung von 1/200 wiederholt. Dabei zeigten alle 4 Peptide im Vergleich zur 1/50-Verdünnung Besonderheiten (Tab. 16 u. Abb. 20):

1. Bei BILF1 (123-135) übersteigen die Mittelwerte der NPC- und IM-Patienten die Negativgruppe um einen geringeren Faktor als in der niedrigeren Verdünnungsstufe (1/50). Der Maximalwert innerhalb des Peptidblocks hat sich von der NPC-Gruppe (1/50-Reihe) auf die frischen Infektionen (1/200-Reihe) verlagert.
2. Für BLLF1 (502-514) ergibt sich eine auffällige Verschiebung des Reaktionsmusters im Vergleich zum Verdünnungsgrad 1/50: die NPC-

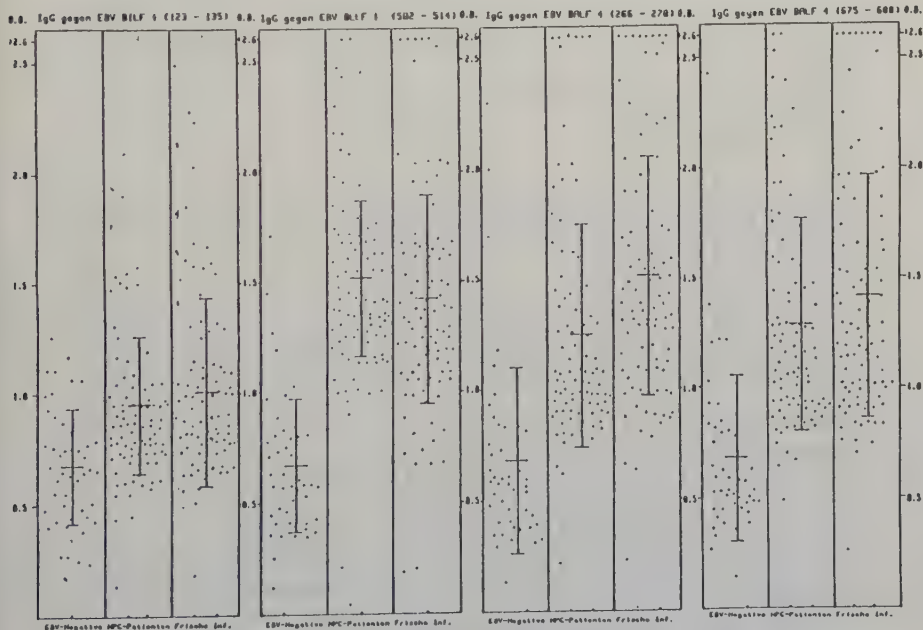


Abb. 20: Verteilungsdiagramme von OD-Werten in verschiedenen Gruppen von Humanseren (Verdünnung 1/200) beim Einsatz von IgG gegen spezifische EBV-Peptide. $\bar{m}$ und $\pm s$ sind als Säulendiagramme eingezeichnet.

und IM-Patienten übertreffen den Mittelwert der EBV-Negativen um mehr als das 2,1fache. Das Maximum verschob sich von der IM- auf die NPC-Gruppe. Dieser Befund wäre für diagnostische Zwecke beachtenswert.

3. Die Reaktionsmuster der beiden Antigene aus dem BALF⁴-Leserahmen sind ähnlich: von den EBV-Negativen ausgehend manifestiert sich über die NPC- bis hin zu den IM-Patienten eine Stufenbildung der Mittelwerte; dabei liegen die Meßwerte der frischen Infektionen um mehr als das Doppelte über denen der negativen Gruppe, und $\pm$ s der beiden Patientengruppen haben unter dem jeweiligen Peptid nur einen kleinen gemeinsamen Bereich.

Die beiden höchsten Werte erreichten in der IgG-Reihe (1/200-Verdünnung) die NPC-Patienten bei BLLF¹ (502-514) mit einer OD von 1.518 und die frisch Infizierten bei BALF⁴ (266-278) mit einer OD von 1.515. Im Vergleich zur Verdünnungsstufe 1/50 haben sich also die Maxima der NPC-Gruppe von BILF¹ (123-135) und der IM-Gruppe von BALF⁴ (675-688) auf BLLF¹ (502-514) bzw. BALF⁴ (266-278) beim Verdünnungsgrad 1/200 verlagert.

3.2.4.1.3 IgM-Reihe

Die Patientengruppen reagierten innerhalb der 6 Antigene ziemlich indifferent. Der Kongruenzbereich ihrer Standardabweichungen war bei jedem Peptid so groß, daß eine diagnostische Verwertbarkeit der hergestellten Antigene unter den erprobten Bedingungen mit IgM als zweitem AK außer Betracht bleiben dürfte. Außerdem unterschieden sich die Mittelwerte der Serengruppen bei den verschiedenen Peptiden nur geringfügig und zeigten kein charakteristisches Profil (Tab. 17 u. Abb. 21). Insgesamt läßt sich feststellen:

1. In jeder Peptidgruppe haben die IM-Patienten den höchsten $\bar{m}$, die stärkste s und den größten s_m .
2. Lediglich bei BALF⁴ (675-688) nehmen die EBV-Negativen den niedrigsten Durchschnittswert innerhalb der übrigen Patientengruppen ein.
3. Bei BILF¹ und BILF² zeichnet sich für die abgelaufenen Infektionen der kleinste $\bar{m}$ in der entsprechenden Antigengruppe ab.
4. Für BLLF¹ (793-805 und 502-514) sowie BALF⁴ (266-278) erreichen die NPC-Seren unter den Patientengruppen den niedrigsten $\bar{m}$.

Peptidgruppe	Patientengruppe	$\bar{m}$	s	s_m
BLLF1 (793-805)	EBV-Negative	0.184	0.086	0.013
BLLF1 (793-805)	NPC-Patienten	0.174	0.071	0.011
BLLF1 (793-805)	FrISChe Infektionen	0.252	0.278	0.029
BLLF1 (793-805)	Abgelaufene Infektionen	0.187	0.119	0.017
BILF1 (123-135)	EBV-Negative	0.146	0.050	0.007
BILF1 (123-135)	NPC-Patienten	0.205	0.063	0.009
BILF1 (123-135)	FrISChe Infektionen	0.227	0.161	0.017
BILF1 (123-135)	Abgelaufene Infektionen	0.137	0.072	0.011
BLLF1 (502-514)	EBV-Negative	0.222	0.054	0.008
BLLF1 (502-514)	NPC-Patienten	0.211	0.053	0.008
BLLF1 (502-514)	FrISChe Infektionen	0.363	0.263	0.027
BLLF1 (502-514)	Abgelaufene Infektionen	0.280	0.093	0.014
BILF2 (48- 60)	EBV-Negative	0.315	0.109	0.016
BILF2 (48- 60)	NPC-Patienten	0.323	0.147	0.022
BILF2 (48- 60)	FrISChe Infektionen	0.395	0.437	0.045
BILF2 (48- 60)	Abgelaufene Infektionen	0.266	0.218	0.032
BALF4 (266-278)	EBV-Negative	0.200	0.185	0.027
BALF4 (266-278)	NPC-Patienten	0.166	0.054	0.008
BALF4 (266-278)	FrISChe Infektionen	0.348	0.433	0.045
BALF4 (266-278)	Abgelaufene Infektionen	0.269	0.100	0.015
BALF4 (675-688)	EBV-Negative	0.172	0.120	0.018
BALF4 (675-688)	NPC-Patienten	0.185	0.066	0.010
BALF4 (675-688)	FrISChe Infektionen	0.402	0.392	0.041
BALF4 (675-688)	Abgelaufene Infektionen	0.259	0.219	0.032

Tab. 17: Mittelwerte ($\bar{m}$), Standardabweichungen (s) und Standardfehler (s_m) bei Verteilungsdiagrammen von OD-Werten in verschiedenen Gruppen ausgewählter Humanseren (Verdünnung 1/50). IgM wurde als AK gegen die einzelnen Peptide getestet. Die Seren der 4 Patientengruppen wurden beim ELISA in folgenden Mengen eingesetzt: EBV-Negative (n=46), NPC-Patienten (n=46), frISChe Infektionen (n=93) und abgelaufene Infektionen (n=46). Die Berechnung der dargestellten Parameter erfolgte nach RIEDWYL (1978). $\bar{m} \pm s$ werden in Abb. 21 unter den entsprechenden Patientengruppen als Säulendiagramme wiedergegeben.

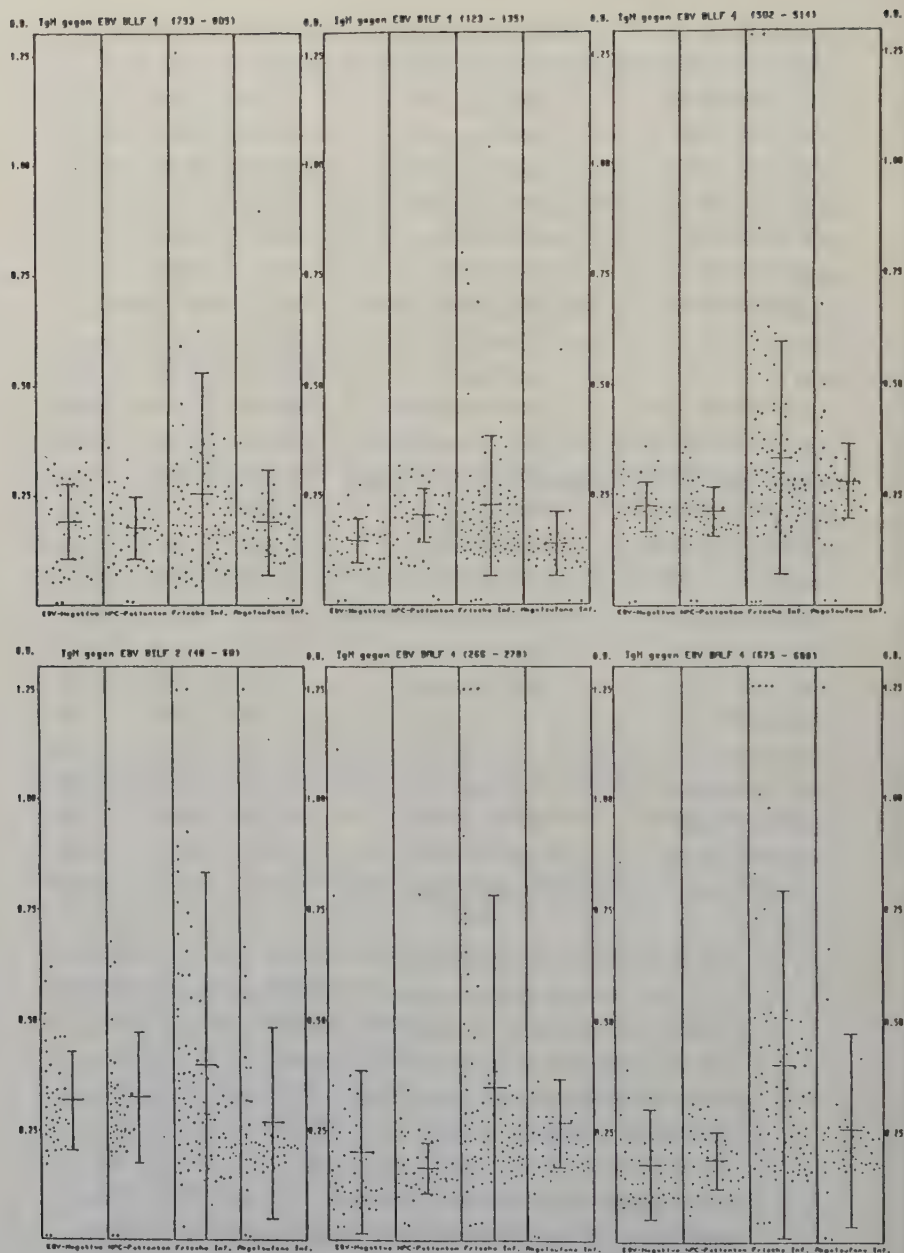


Abb. 21: Verteilungsdiagramme von OD-Werten in verschiedenen Gruppen von Humanseren (Verdünnung 1/50) beim Einsatz von IgM gegen spezifische EBV-Peptide. $\bar{m}$ und $\pm s$ sind als Säulendiagramme eingezeichnet.

3.2.4.2 Geometrische Verdünnungsreihen einiger Humansenen mit IgA, IgG und IgM gegen die hergestellten Peptide

Diese Testreihen wurden - wie unter 3.1.6 erwähnt - mit 6 NPC- und 2 EBV-negativen Seren durchgeführt und für IgA und IgG als Polygone dargestellt (Abb. 22-24). In die Zeichnungen wurden jeweils die 2,1fachen Werte der EBV-Negativen aufgenommen, um feststellen zu können, bis zu welchem Verdünnungsgrad eine positive diagnostische Aussage möglich ist. Dieses Spektrum erstreckt sich für IgA von 1/10 bis 1/40 und für IgG von 1/20 bis 1/10.240.

IgA-Reihe

Bei sämtlichen Peptiden haben die Seren einen geringeren AK-Titer als in der IgG-Serie aufzuweisen. Hinsichtlich der Titerhöhe läßt sich für die einzelnen Antigene eine Reihenfolge mit fallender Tendenz angeben:

BALF4 (675-688) → BLLF1 (793-805) → BLLF1 (502-514) →

BALF4 (266-278) → BILF1 (123-135) → BILF2 (48- 60).

Dabei sind das erste Peptid im oberen, die 4 nächsten im mittleren und BILF2 (48-60) im unteren Bereich einzuordnen.

IgG-Reihe

Auch in dieser Serie kann eine Rangordnung nach abnehmenden AK-Titern für die einzelnen Antigene aufgestellt werden:

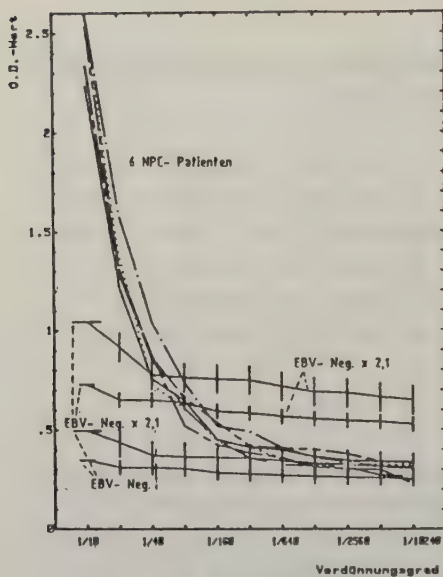
BLLF1 (793-805) → BILF2 (48- 60) → BALF4 (675-688) →

BALF4 (266-278) → BLLF1 (502-514) → BILF1 (123-135).

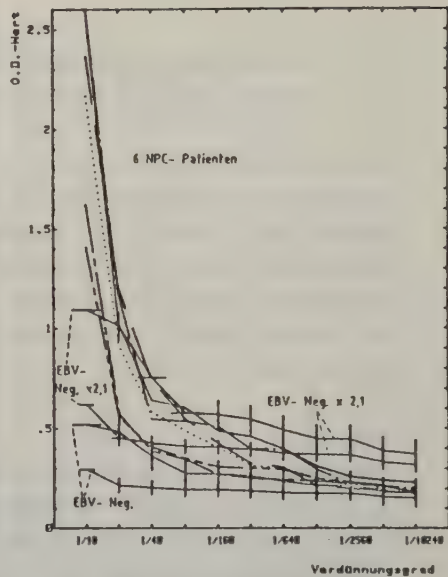
Im IgG-Block waren die OD-Werte eines negativen Serums unverwertbar und wurden daher nicht abgebildet.

IgM-Reihe

Die geometrischen Verdünnungsreihen mit IgM als zweitem AK waren für eine graphische Wiedergabe irrelevant. Die NPC-Seren reagierten indifferent und lagen mit ihren ODs zwischen 0.013 und 0.952. Bei jedem Antigen hatten in den entsprechenden Verdünnungsgraden die EBV-Negativen eine merklich höhere OD als die Seren der NPC-Patienten. Die Peptide aus dem BLLF1-Leserahmen reagierten stärker als die aus BALF4 und diese wiederum deutlicher als jene aus BILF1 und BILF2. BILF2 hatte mit einer wesentlichen Abstufung gegen BILF1 die geringsten Titerhöhen aufzuweisen.



IgG gegen EBV BLLF 1 (793 - 805)



IgG gegen EBV BILF 1 (123 - 135)

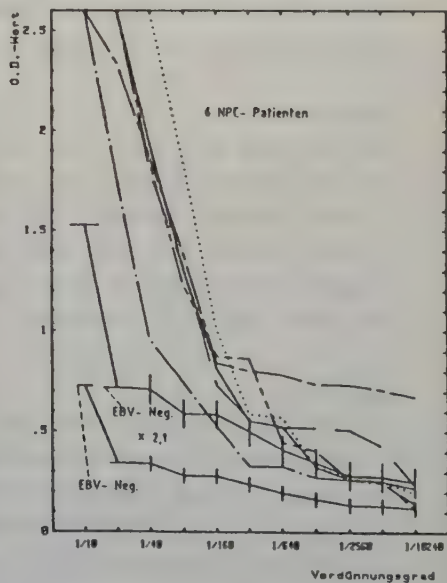
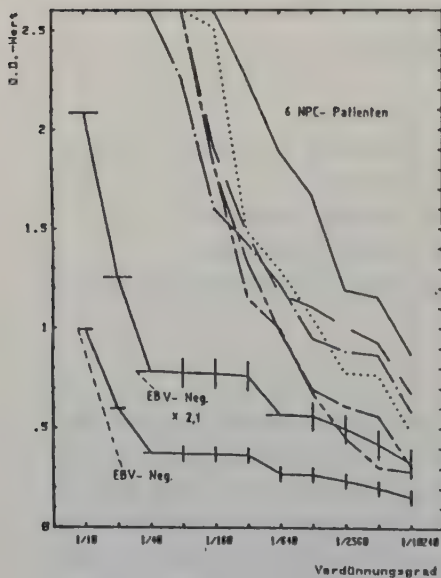
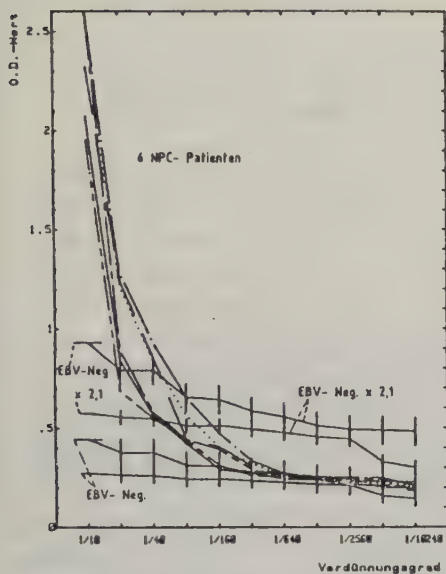
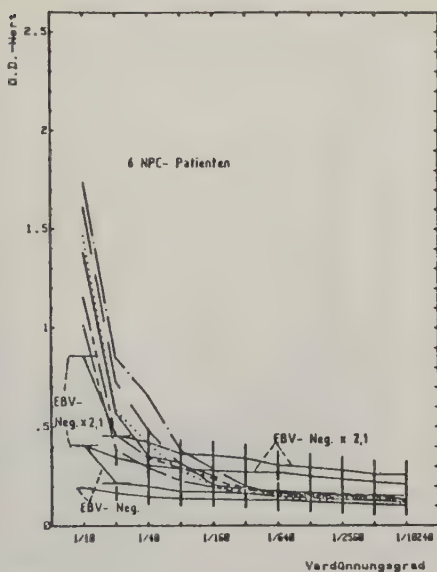


Abb. 22: Geometrische Verdünnungsreihen (1/10 - 1/10.240) verschiedener Humansenen bei IgA und IgG gegen BLLF 1 (793-805) bzw. BILF 1 (123-135) vergleichend.

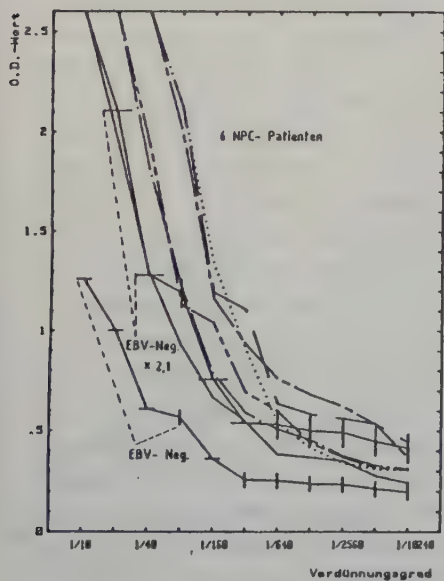
IgA gegen EBV BLF 1 (502 - 514)



IgA gegen EBV BILF 2 (48 - 60)



IgG gegen EBV BLF 1 (502 - 514)



IgG gegen EBV BILF 2 (48 - 60)

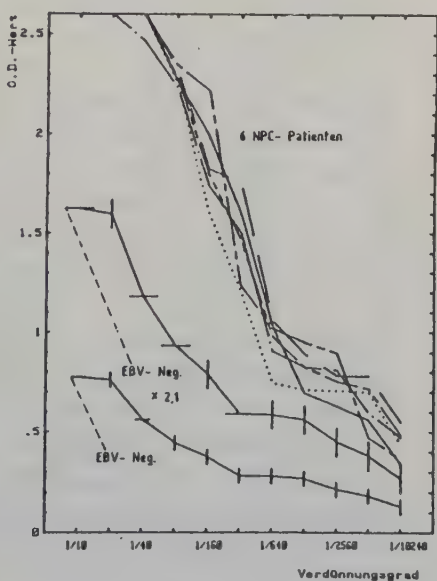
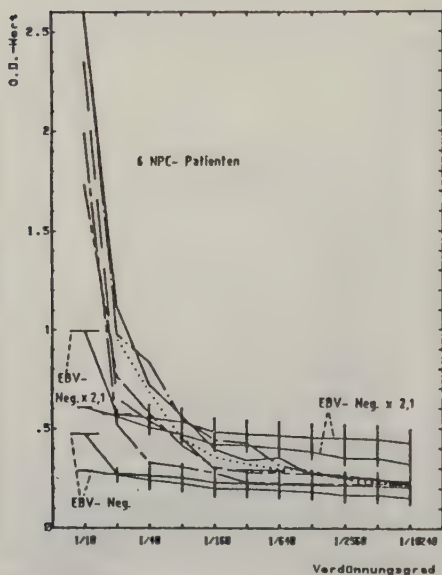
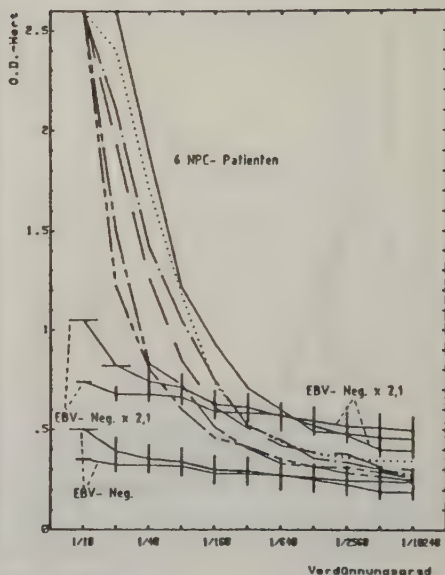


Abb. 23: Geometrische Verdünnungsreihen (1/10 - 1/10.240) verschiedener Humanseren bei IgA und IgG gegen BLF 1 (502-514) bzw. BILF 2 (48-60) vergleichend.

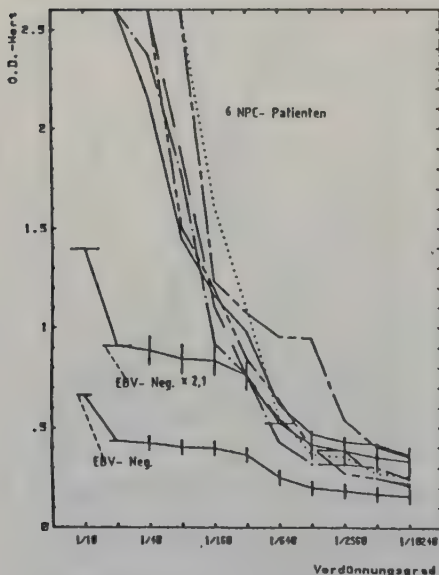
IgA gegen EBV BALF 4 (266 - 278)



IgA gegen EBV BALF 4 (675 - 688)



IgG gegen EBV BALF 4 (266 - 278)



IgG gegen EBV BALF 4 (675 - 688)

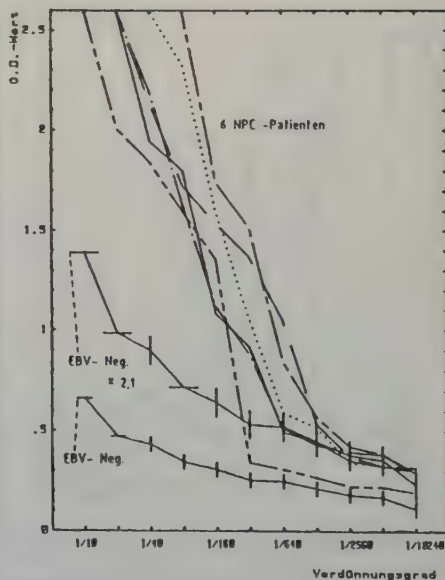


Abb. 24: Geometrische Verdünnungsreihen (1/10 - 1/10.240) verschiedener Humanseren bei IgA und IgG gegen BALF 4 (266-278) bzw. BALF 4 (675-688) vergleichend.

3.2.5 In vivo gewonnene AK-Titer und Reaktionsintensität der betreffenden Antigene beim Austesten von Humansenen im ELISA - eine Gegenüberstellung der Ergebnisse

Vergleicht man die in Kaninchen gewonnenen AK-Titer nach der 4. Auffrischungsimpfung (Abb. 17) mit den Verteilungsdiagrammen der IgG-Reihe (1/50-Verdünnung, Abb. 19), so zeigen die 6 Peptide hinsichtlich eines abnehmenden AK-Titers bis auf einen einzigen Positionswechsel dieselbe Abfolge:

Abb. 17 (Geometrische Verdünnungsreihen der Kaninchenserum):

BALF4 (675-688) → BALF4 (266-278) → BLLF1 (502-514) →
BLLF1 (793-805) → BILF1 (123-135) → BILF2 (48-60).

Abb. 19 (Verteilungsdiagramme der IgG-Serie, Serumverdünnung 1/50):

BALF4 (675-688) → BALF4 (266-278) → BLLF1 (793-805) →
BLLF1 (502-514) → BILF1 (123-135) → BILF2 (48-60).

Greift man Einzelwerte aus dem Gesamtbild heraus, so betragen z.B. die gemittelten ODs der Patientengruppen des Peptids BALF4 (675-688) ca. das Doppelte von denen bei BILF2 (48-60); dies verdeutlicht Tab. 15.

Auch für die Verteilungsdiagramme der IgA-Reihe (Abb. 18) ergibt sich im Hinblick auf die Reaktionsintensität der einzelnen Peptide ein ähnliches Bild: die Antigene aus dem BALF4-Leserahmen liegen deutlich an der Spitze. Nach einer erheblichen Abstufung folgen BLLF1 (502-514) sowie BILF2 (48-60) und BLLF1 (793-805), wobei die beiden letzten kaum einen Unterschied in ihrem Reaktionsmuster erkennen lassen. Die niedrigsten Antititer hat hier das Antigen aus BILF1 (123-135).

Die Betrachtung sämtlicher Verteilungsdiagramme und geometrischer Verdünnungsreihen sowie der in vivo gewonnenen Antititer erlaubt schließlich folgende Bewertung (Tab. 18):

Unter den 6 getesteten EBV-Peptiden kann jenen aus dem BALF4-Leserahmen die größte antigene Potenz zugesprochen werden. Allerdings stehen ihnen diejenigen aus BLLF1 nur geringfügig nach. Von hier aus ist die Abstufung zum BILF2 recht deutlich, insofern die Verteilungsdiagramme des IgM-Blocks (Abb. 21) unbeachtet bleiben. Im Vergleich zu den übrigen Oligopeptiden ist die Reaktionsintensität bei BILF1 insgesamt am geringsten, denn es war in sämtlichen Untersuchungsreihen an (vor-)letzter Position einzustufen.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
BALF ⁴ (266-278)	2	1	2	2	4	4	4	4	2
BALF ⁴ (675-688)	1	2	1	3	3	1	3	3	1
BLLF ¹ (502-514)	3	3	4	1	2	3	5	2	2
BLLF ¹ (793-805)	4	5	3	-	5	2	1	1	3
BILF ¹ (123-135)	5	6	5	4	6	5	6	5	5
BILF ² (48- 60)	6	4	6	-	1	6	2	6	4

Tab. 18: Reaktionsintensität der synthetisierten Oligopeptide bei verschiedenen Untersuchungsreihen. Sie wird für die jeweiligen Rubriken in abnehmender Reihenfolge mit 1-6 angegeben.

A: Geometrische Verdünnungsreihen der Kaninchenserum (1/80 - 1/81.920) gegen IgG (Abb. 17)

B: Verteilungsdiagramme von Humanserum (Verdünnung 1/50) gegen IgA (Abb. 18)

C: Verteilungsdiagramme von Humanserum (Verdünnung 1/50) gegen IgG (Abb. 19)

D: Verteilungsdiagramme von Humanserum (Verdünnung 1/200) gegen IgG (Abb. 20)

E: Verteilungsdiagramme von Humanserum (Verdünnung 1/50) gegen IgM (Abb. 21)

F: Geometrische Verdünnungsreihen bei Humanserum (1/10 - 1/10.240) gegen IgA (Abb. 22-24)

G: Geometrische Verdünnungsreihen bei Humanserum (1/10 - 1/10.240) gegen IgG (Abb. 22-24)

H: Geometrische Verdünnungsreihen bei Humanserum (1/10 - 1/10.240) gegen IgM (ohne Abb.)

I: Gesamtbild aus sämtlichen Untersuchungsreihen aufgrund des Mittelwerts von A-H.

3.2.6 Ergebnisse der Immunpräzipitation mit anti-Peptidserum aus Kaninchen

Bisher konnten mit Antiserum gegen Peptide aus BALF⁴, BILF¹ und BILF² in B95-8-Zellextrakten Proteine von 105 kD, 75 kD bzw. 58 kD identifiziert werden; theoretisch wären 90 kD, 35 kD bzw. 27 kD zu erwarten gewesen. Diese Abweichungen können durch N-Glykosilierungen und Modifikationen wie zusätzliche Sequenzen, die an das NH₂-terminale Ende gebunden sind, erklärt werden.

Gegen BLLF1 (gp 250/350) wurde noch keine Reaktion beobachtet, was auf die kleine Menge dieses Proteins, die in B95-8-Zellen exprimiert wird, zurückzuführen sein könnte. Außerdem repräsentiert dieses Peptid ein relativ kleines Epitop des großen Glycoproteins. Dieser Antigenbereich wurde aufgrund der Faltung oder Abdeckung durch benachbarte Zuckergruppen von den spezifischen Antisera bei der Immunpräzipitation nicht erkannt.

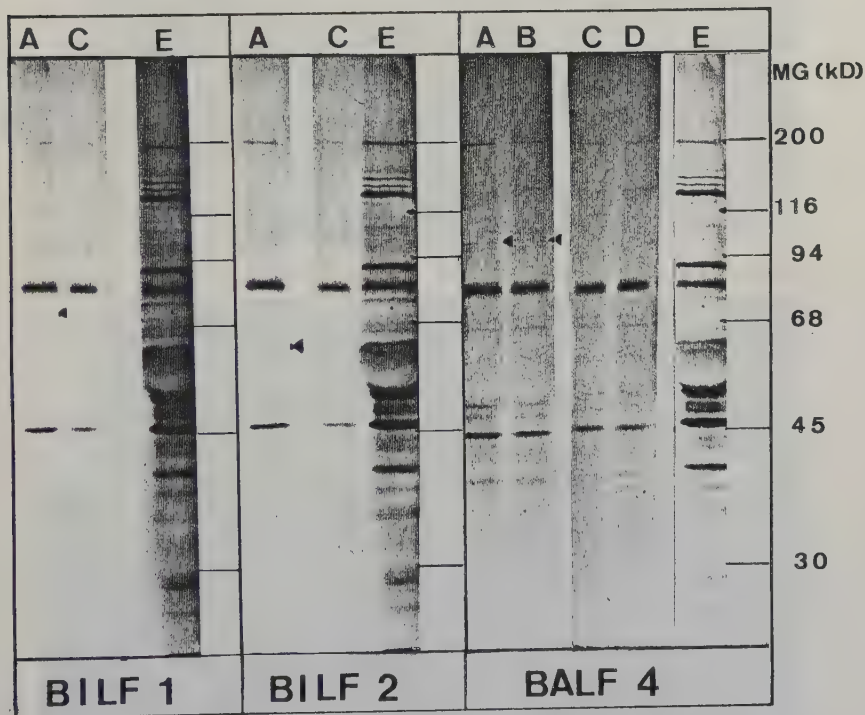


Abb. 25: Immunpräzipitate von Seren gegen 3 Peptide verschiedener Leserahmen A/B = positive Kaninchenseren; C/D = negative Kaninchenseren; E = Gemisch aus Humanseren EBV-positiver Patienten; ◀ = EBV-Protein-Bande, gegen die das spezifische Antiserum gerichtet ist (Bande mit 75 kD bei BILF1, mit 58 kD bei BILF2 und mit 105 kD bei BALF4). Anhand einer Markermischung wurden am rechten Bildrand der jeweiligen Präzipitate die entsprechenden Molekulargewichte eingezeichnet.

3.2.7 Immunfluoreszenz-Reaktion von Antipeptidseren

Anhand der unter 3.1.8 aufgezeigten Technik konnten bei einem Teil der in Kaninchen gewonnenen Antiseren gegen die synthetischen Peptide Immunfluoreszenzen nachgewiesen werden. Die unter dem Mikroskop aufgenommenen Fotografien stammen aus 3 verschiedenen Leserahmen: BALF⁴ (266-278), BLLF¹ (793-805) und BILF¹ (123-135). Bisher konnte bei den Antiseren aus BILF² (48-60) keine IF demonstriert werden. Da mit jedem Antigen ein Tierpaar immunisiert wurde, lassen sich gegebenenfalls auch Antiseren zum gleichen Peptid aus 2 Kaninchen vergleichen. Bei BLLF¹ und BILF¹ zeigte jeweils ein Serum eine sehr ausgeprägte IF. Weniger markant war sie beim zweiten Tier des gleichen Antigens (BLLF¹) und bei BALF⁴, wo sie nur bei einem Kaninchenserum erschien. Als Negativkontrolle wurden BJAB-Zellen verwendet, die mit einem anti-BILF¹-Serum inkubiert wurden.

Normalerweise liegt den Aufnahmen eine BLZ von 1,5 min. zugrunde. Für BLLF¹ wird der gleiche Bildausschnitt mit einer BLZ von 1,5 min. dem bei 3 min. gegenübergestellt. Daraus resultiert eine wesentlich stärkere Hintergrundreaktion infolge der längeren Belichtung.

Die durchgeführten IF-Teste beruhen ausschließlich auf Antiseren von 12 Kaninchen nach einer 4maligen Boosterung. Zu den Legenden der Abb. 26-30 wird in Klammern die Nummer des Tieres angegeben, von dem das entsprechende Serum stammt.

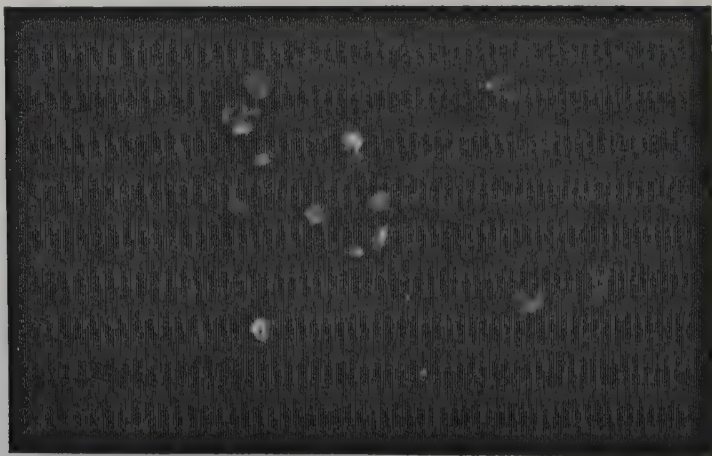


Abb. 26: Negativkontrolle einer IF nach der Inkubation von BJAB-Zellen mit einem anti-BILF¹-Serum (Kan. Nr. 3).

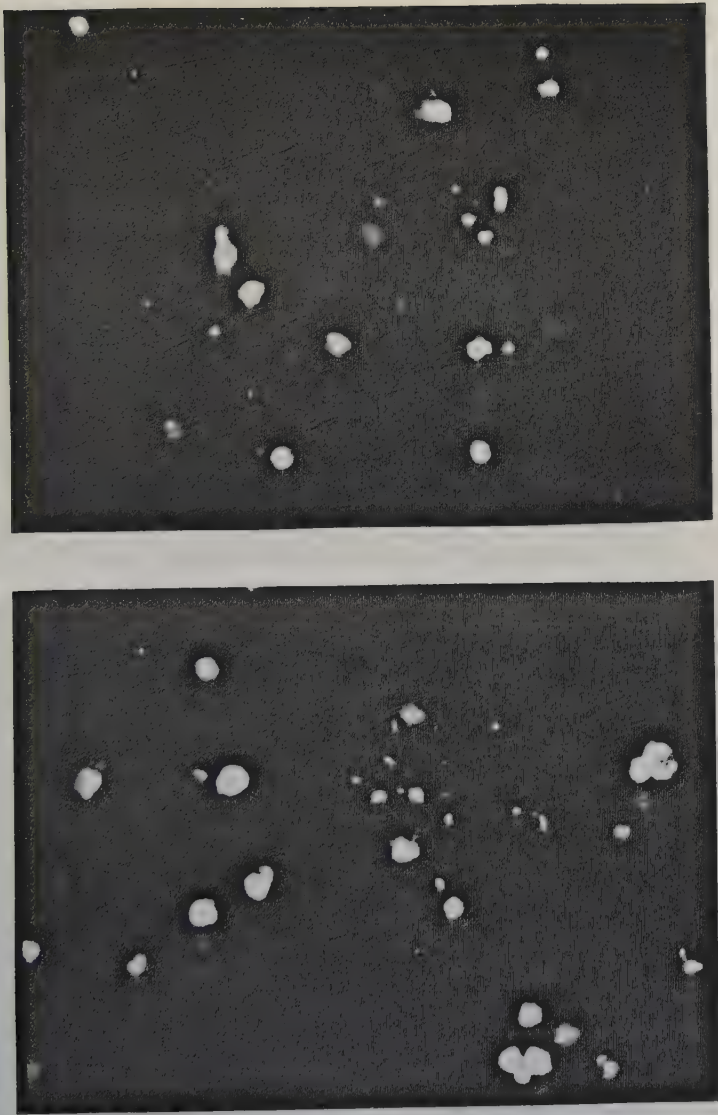


Abb. 27: Vergleich der IF bei einem Tierpaar nach der Immunisierung gegen BILF1 (123-135).

Oben: Inkubation von B95-8-Zellen mit dem Kan.-serum Nr. 3.

Unten: Inkubation von B95-8-Zellen mit dem Kan.-serum Nr. 4.

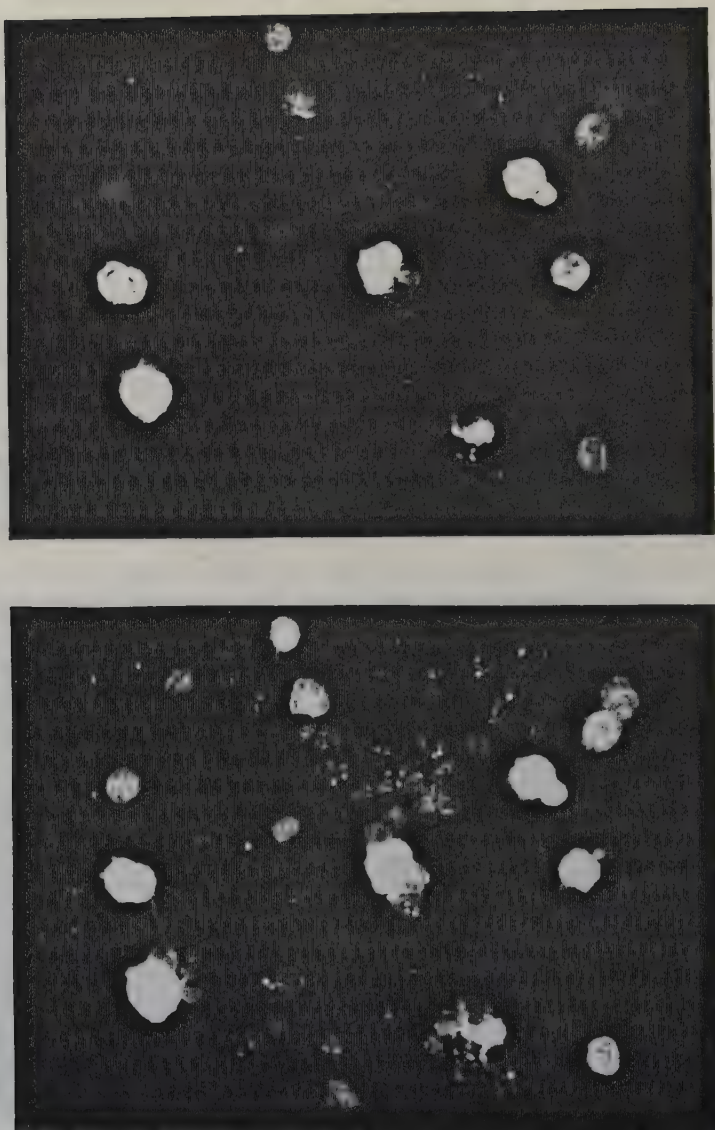


Abb. 28: IF nach der Inkubation von B95-8-Zellen mit anti-BLLF1-Serum (Kan. Nr. 1). Gegenüberstellung von 2 identischen Bildausschnitten bei unterschiedlichen Belichtungszeiten (oben 1,5 min., unten 3 min.).

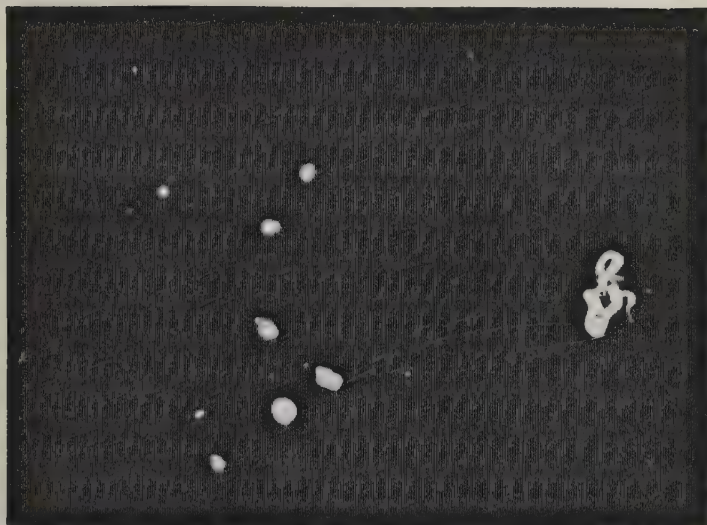


Abb. 29: IF nach der Inkubation von B95-8-Zellen mit anti-BLLF1-Serum (Kan. Nr. 2). Vgl. die intensivere Reaktion des Tieres Nr.1 beim gleichen Peptid in Abb. 28.

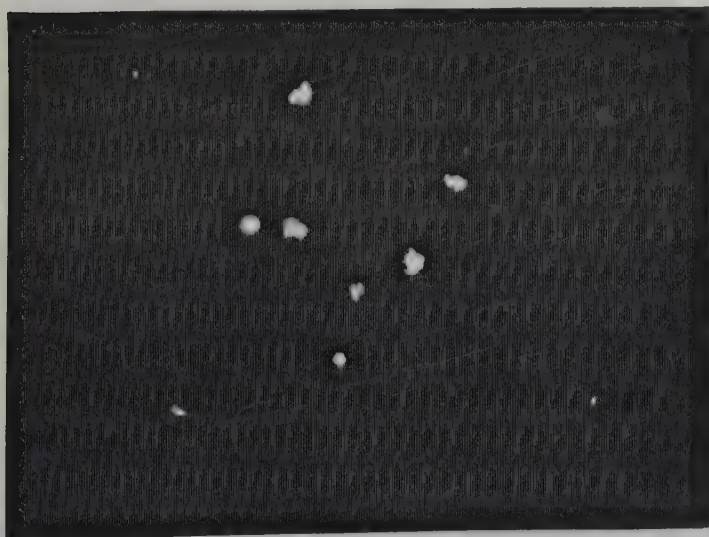


Abb. 30: IF nach der Inkubation von B95-8-Zellen mit anti-BALF4-Serum (Kan. Nr. 9).

4 DISKUSSION

=====

Das Gesamtergebnis der Arbeit unterstreicht die Zuverlässigkeit der angewandten Computerprogramme zur Charakterisierung potentieller Antigenstellen auf EBV-viralen Proteinmembranen. Die hergestellten Antigene des EBV-Genoms konnten in vivo eine monospezifische AK-Bildung induzieren. Auf Faktoren zur Stimulierung der Antititer wird weiter unten näher eingegangen. Die Antiseren der Kaninchen wurden zur Identifizierung EB-viraler Proteine im Western Blotting eingesetzt und zeigten ein negatives Ergebnis. Dagegen gelang ihre Identifizierung in der Immunfluoreszenz und -präzipitation, insofern die anti-BILF2-Seren bei der ersten und die anti-BLLF1-Seren bei der zweiten Technik unberücksichtigt bleiben. Die Resultate der einzelnen Verfahren werden anschließend diskutiert.

Der serodiagnostische Nutzen der produzierten Antigene ließ sich im ELISA anhand verschiedener Patientengruppen - zumindest partiell - nachweisen. Daher wird die Anwendbarkeit der synthetisierten Oligopeptide bei serodiagnostischen Reihenuntersuchungen zu besprechen sein. Ebenso ist ihr Einsatz als Vakzine zur Prävention EBV-korrelierter Erkrankungen - vor allem in Hochrisikogebieten - zu erwägen.

Aufgrund der genannten Aspekte wurde die folgende Diskussion in 5 Abschnitte untergliedert.

4.1 COMPUTERVORHERSAGE ANTIGENER BEREICHE UND IHRE EXPERIMENTELLE BESTÄTIGUNG

Zur Gewinnung definierter und reiner EBV-Antigene bieten sich 3 verschiedene Wege an: die gentechnologische Herstellung in Zellsystemen (MOTZ, 1986), die chemische Synthese von Oligopeptiden aus immunogenen Proteinregionen und die Reinigung aus infizierten Zellen. In allen Fällen bietet die Computeranalyse antigener Epitope eine erhebliche Verbesserung der Möglichkeiten; die Aussagekraft der theoretischen Befunde ließ sich sowohl für die Gentechnologie (MOTZ, 1986) als auch die Festphasensynthese (MODROW et al., 1987 a u. b) experimentell bestätigen. Wegen der für EBV typischen geringen Produktion viraler Proteine scheidet die Reinigung virusinfizierter Zellen als dritte Methode der Antigendarstellung aus.

4.2 EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE TITERHÖHE DER IN VIVO GEWONNENEN ANTISEREN

Um mit kurzkettigen Peptid-Antigenen eine effektive Immunisierung zu erreichen, müssen diese mit einem Carrier oder Proteinträger konjugiert werden (LIU et al., 1979; HOPP, 1984). Zwar kann auch ein freies Peptid die Synthese von meßbaren Antikörpertitern hervorrufen, jedoch sind diese bei einem Palmitinsäure-Konjugat stets beachtlich höher und erreichen ca. 6 Wochen nach der Erstinjektion ein Maximum. Allerdings fallen sie auch bei der Palmitinsäure-Konjugation 9 Wochen nach der Injektion deutlich ab. Fehlen weitere Auffrischungsimpfungen, so werden die Antikörpertiter sowohl bei freien als auch konjugierten Peptiden geringer, wobei sie in der Gruppe mit einem Trägermolekül am deutlichsten abnehmen. Nach HOPP (1984) gelten Fettsäure-Konjugate als ideale Träger für chemisch synthetisierte Peptide und scheinen die Antikörpertiter um mehr als das 4fache zu steigern.

Auch wenn sich durch die Anzahl der Boosterungen die spezifischen Antikörper erhöhen lassen, pendelt sich nach einigen Auffrischungsimpfungen ein bestimmter Maximalwert ein, der durch weitere Boosterungen innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums nicht mehr gesteigert werden kann. Diese Folgerung lassen zumindest 2 der 6 getesteten Antigene aufgrund ihres Titerverlaufs zu (Abb. 17; BILF1 und BALF4, 266-278). Generell können die unterschiedlichen Titerhöhen der 6 geprüften Oligopeptide bei gleicher Applikationsform auf zweifache Weise erklärt werden: einerseits verfügen sie aufgrund der räumlichen Anordnung und AS-Sequenz über verschiedene antigene Determinanten, die ihrerseits eine entsprechend unterschiedliche AK-Induktion in vivo bewirken. Andererseits sind unterschiedliche genetische Dispositionen bei den eingesetzten Kaninchen zu berücksichtigen, so daß selbst beim gleichen Peptid 2 Tiere recht verschieden zu reagieren vermögen (Abb. 17, BILF2).

Die Kettenlänge der synthetisierten Oligopeptide schwankt zwischen 12 bis 14 AS und läßt damit keinen Rückschluß auf ein differenziertes antigenes Potential zu. Die Synthese größerer Epitopbereiche läßt eine bessere Anpassung an das native EBV-Protein erwarten. Dieses Faktum hätte in vivo vermutlich eine stärkere AK-Bildung zur Folge.

Bereits 1981 hatten LERNER et al. im Rahmen von Studien mit dem HBsAg darauf hingewiesen, daß bei der Aminosäure Prolin häufig Richtungsänderungen in der Sekundärstruktur auftreten, die mit guten anti-

genen Eigenschaften kombiniert sind. Außerdem kommen bei Cysteinen innerhalb einer Proteinkette oder zwischen Ketten Disulfidbrücken vor, die die Konformation des Moleküls wesentlich beeinflussen und gegen Denaturierungen und Digestionen stabilisieren. Eine Reduzierung dieser Brücken führt oft zum kompletten Verlust der reaktiven Antigenität. Alle wirksamen Peptide enthielten mindestens einmal die Aminosäure Prolin.

Bei den hergestellten 6 Antigenen aus dem EBV-Genom war Prolin mit Ausnahme von BALF4 (266-278) in allen Sequenzen einmal vertreten. Das Peptid aus diesem Leserahmen zeigte im Vergleich zu den übrigen aber keineswegs eine schwächere AK-Bildung. Es ist durchaus denkbar, daß das Vorkommen bestimmter Aminosäuren und/oder deren Sequenz in einer definierten Peptidkette einen mehr oder weniger starken Einfluß auf die antigenen Eigenschaften des jeweiligen Epitops haben; allerdings läßt sich dieses Kriterium im Rahmen der vorgenommenen Synthesen nicht näher beurteilen.

Die erfolgte AK-Bildung gegen ein bestimmtes Peptid dürfte nicht nur von seiner Oberflächenstruktur abhängen, sondern auch von der spezifischen Dauer, über die es in Lösung seine natürliche Konformation beizubehalten vermag. Im allgemeinen lassen sich durch die Synthese von Peptiden, deren NS-Sequenzen determiniert wurden, selbst dann AK gegen native Moleküle gewinnen, wenn die ausgewählten Epitope nur eine kleine Region des natürlichen Proteins darstellen.

Unmittelbar vor der parenteralen Applikation wurden die synthetischen Oligopeptide in Freund'schem Adjuvans emulgiert. Solche durch die ansynthetisierte Palmitinsäure hervorgerufene Mizellen-ähnliche Substanzen haben stark immunogene Eigenschaften und sorgen für eine Erhöhung der Immunitätsstufe und -dauer. Die Emulsion hält das Antigen zurück und formt gleichsam ein Depot, von welchem das Peptid langsam freigesetzt wird. Auf diese Weise kann eine stetige Antigenlieferung durch ein sich replizierendes Virus simuliert werden (LERNER, 1983). Dem kompletten Adjuvans sind abgetötete Mykobakterien beigelegt. Diese aktivieren Zellen, die bei der Stimulation der Immunabwehr wichtig sind. Somit dient das komplette Freund'sche Adjuvans gewissermaßen als "Reizstoff", der an der Injektionsstelle Wunden und Abszesse verursachen kann. Der inkomplette Typ, dem lediglich die Mykobakterium-Komponente fehlt, bewirkte mit den angewandten Oligopeptiden eine weitaus geringere Reaktionsintensität. Es wird angenommen, daß Zellmembranteprivate des Mykobakteriums über die Freisetzung Antigen-unspezifischer

Modulatoren wie Interleukin 2 die Antikörpertiter der jeweiligen Peptide signifikant steigern. Schließlich sorgen Emulgatoren in Verbindung mit einem Immunogen für dessen günstige Verteilung und verzögerten Abbau im Organismus; dies vermag letztlich die Wirkung eines Antigens zu stimulieren.

Derart drastische Adjuvanzen wie das Freund'sche sind in der Humanmedizin nicht einsetzbar und werden unter anderem durch Aluminium oder Aluminiumhydroxid ersetzt. Wegen der schwerwiegenden Nebenwirkungen des kompletten Typs (subkutane Abszesse, Wunden u.a.) wurde seine Anwendung bei den durchgeführten Tierversuchen auf die erste Verabreichung des betreffenden Peptids beschränkt. Es ist bemerkenswert, daß daraufhin ein einziges Kaninchen keinen pathologischen Befund an den Injektionsstellen zeigte und gleichzeitig den niedrigsten Antikörpertiter unter den 12 Tieren aufwies; dieser konnte von der 2. bis 4. Auffrischungsimpfung auch nicht mehr erhöht werden (Abb. 17; BILF2, 8/2 und 8/4). Das läßt vermuten, daß subkutane Abszesse infolge der mykobakteriellen Komponente im kompletten Adjuvans mit einer sehr starken AK-Bildung verbunden sind.

4.3 CHARAKTERISIERUNG EPSTEIN-BARR VIRUS-SPEZIFISCHER MEMBRANPROTEINE DURCH SYNTHETISCHE OLIGOPEPTIDE

Die Charakterisierung EBV-spezifischer Membranproteine anhand synthetischer Oligopeptide wurde in 3 verschiedenen Testverfahren, dem Western Blotting, der Immunpräzipitation und -fluoreszenz, versucht. Dabei zeigte sich, daß die nativen EBV-Proteine durch anti-Peptidseren relativ kleiner Epitope (12 bis 14 AS) mit Hilfe EBV-spezifischer Zellextrakte (s. Abb. 15) in Western Blots nicht nachzuweisen waren. Dafür scheinen technische Kriterien wie z.B. Blottzeit (4 h) und Verdünnungsgrad der Seren (1/50) weniger in Frage zu kommen. Vielmehr sollten die in vivo sehr geringen Mengen exprimierter Gene und der Denaturierungsumfang dieser Methode bei den eingesetzten Zellen erwogen werden. Durch eine Verminderung oder ein Wegfallen von Zwischenbindungen (H-Brücken, Disulfidbrücken) und Van der Waals-Kräften könnte eine definierte Peptidsequenz bzw. -struktur ihre native Stabilität und/oder Konfiguration so weit einbüßen, daß sich spezifische Antikörper nicht mehr anzulagern vermögen. Folglich würden beim Western Blotting Immunkomplexbindungen unterbleiben und die nativen EBV-Proteine ließen sich auf der Nitrozellulose als spezifische Peptidbanden nicht

mehr identifizieren.

Bei der Immunpräzipitation sind die Zellextrakte vergleichsweise weniger denaturiert, da in Lösung spezifische AG-AK-Komplexe bereits vor der SDS-PAGE gebildet werden. Daher dürften Konformationsänderungen, die durch Erhitzen auf 100°C und Behandlung mit reduzierenden Agenzien (Merkaptoethanol) auftreten, für die Bindungsqualität des Immunkomplexes unbedeutend sein. In den Präzipitaten waren EBV-Protein-Banden von jeweils einem anti-BILF1-, -BILF2- und -BALF4-Serum zu erkennen. Lediglich bei den anti-BLLF1-Seren unterblieb eine positive Reaktion. Bei diesem Glycoprotein mit einem Zuckeranteil von ca. 2/3 der molekularen Masse zeigte sich, daß das kleine ausgewählte Epitop im Gesamtprotein nicht erkannt wurde.

Durch die indirekte IF-Methode waren mit Hilfe FITC-markierter Antiimmunglobuline (swine anti rabbit IgG) fluoreszierende AK-Immunkomplexe bei anti-Peptidseren aus BALF4, BILF1 und BLLF1 nachzuweisen. Jedoch ergab sich auf den fixierten B95-8-Zellextrakten eine unterschiedliche Intensität der Fluoreszenz. Dies zeigten auch Antiseren gegen das gleiche Peptid, aber aus 2 verschiedenen Individuen (vgl. Abb. 28 oben und 29). Ebenso fiel auf, daß nur bei einem Tier des Paares, das gegen BALF4 (266-278) immunisiert wurde, eine IF nachzuweisen war. Dagegen war in der bisherigen Versuchsreihe für Antiseren aus BLLF1 (502-514), BALF4 (675-688) und BILF2 (48-60) keine IF sichtbar. Aufgrund dieser Ergebnisse können die unterschiedlich hohen Antititer, die in den Kaninchen gegen die einzelnen Peptide erreicht wurden, für den IF-Nachweis kein limitierender Faktor sein. Eher muß die Technik, mit der die Zellextrakte auf den Objektträgern fixiert wurden, für die ungleiche Qualität und Quantität der IF in Betracht gezogen werden. Zum einen kann in den einzelnen Beobachtungsfeldern eine verschieden hohe Anzahl von antigenen Erkennungsregionen fixiert, zum anderen können die gesuchten Bindungsstellen durch das Ausstreichen der Zellen in einer geringeren oder größeren Menge denaturiert worden sein, so daß sie von ihren spezifischen Antikörpern nicht mehr erkannt und "besetzt" werden. Dieser Gesichtspunkt muß vor allem deshalb erwähnt werden, weil es sich hier stets um sehr kleine Epitope handelt, bei denen bereits geringste Manipulationen für eine Veränderung der Oberflächenstruktur ausreichen könnten. Im ungünstigsten Fall läßt sich sodann in einem gewissen Betrachtungsfeld, das mit einem bestimmten anti-Peptidserum inkubiert wurde, keine IF erkennen. Da diese Zufallsmomente bei der Zellfixation nicht völlig auszuschließen sind,

müßten die IF-Teste mit dem gleichen Antiserum eines synthetischen Oligopeptids in mehreren Beobachtungsfeldern durchgeführt oder einige Male wiederholt werden, bevor sich definitiv aussagen ließe, ob die Identifizierung eines spezifischen Antiserums in der IF positiv oder negativ verläuft.

4.4 VERWENDUNG SYNTHETISCHER OLIGOPEPTIDE IM ELISA ZUR SEROLOGISCHEN DIAGNOSTIK EBV-KORRELIERTER ERKRANKUNGEN

Die Computeranalyse von Protein-Sekundärstrukturen gestattete in Verbindung mit entsprechenden Hydrophilizitäts-Werten die Identifizierung von hoch antigenen Regionen aus latenten EBV-Membranproteinen des Leserahmens BNLF1 (MODROW u. WOLF, 1986). Nach der Synthese dieser Bereiche, die hydrophile β -Turns enthielten, wurden sie in ELISA-Testen zur Überprüfung von NPC-, IM- und EBV-negativen Seren eingesetzt. Dabei konnten spektralphotometrisch markante Unterschiede zwischen der Reaktionsintensität der NPC- und IM-Patienten im Vergleich zu den gesunden Personen festgestellt werden. Auf denselben Prinzipien beruhte das experimentelle Vorgehen in dieser Arbeit und die damit verbundene Synthese von 6 Oligopeptiden aus 4 verschiedenen Leserahmen des EBV-Genoms. Es konnte gezeigt werden, daß auch kleine Antigene für diagnostische Zwecke im ELISA verwendet werden können und Antikörper zumindest teilweise gegen zusammenhängende Epitope gerichtet sind. Für die serologische Diagnostik glykosilierter viraler Membranproteine ist aber die sorgfältige Auswahl geeigneter Epitope entscheidend (MODROW et al., 1987 a u. b).

4.4.1 Reaktionsintensität EBV-positiver und -negativer Humansenen bei drei verschiedenen Immunglobulinen

Für alle getesteten Peptide kann festgestellt werden, daß die EBV-positiven Seren bei IgA und IgG im ELISA stärker reagierten als die EBV-negativen (Abb. 18-20). Wie aus Abb. 1 hervorgeht, sind die IgM-AK-Titer lediglich bei stummen Primärinfektionen und frischen EBV-Infektionen (IM-Seren) im Vergleich zu den übrigen Patientengruppen deutlich erhöht. Beim Einsatz von IgM gegen die jeweiligen EBV-Peptide (Abb. 21) lagen die AK-Titer der frisch Infizierten tendenziell zwar stets über denen der 3 übrigen Kollektive, jedoch reicht dieses Kriterium für diagnostische Zwecke nicht aus.

Die Inaktivierung und Konservierung der Seren bei -20°C verursacht eine erhebliche Verminderung der ursprünglich vorhandenen und nachweisbaren IgM-Antikörper. Daher ist anzunehmen, daß sich in der Untersuchungsreihe mit IgM bei frisch gewonnenen Seren deutlichere Unterschiede als bei konservierten ergeben hätten: bei allen getesteten Oligopeptiden würden sich vermutlich die IM-Patienten durch eine höhere OD im ELISA klar von den 3 übrigen Personenkreisen abgrenzen lassen. Allerdings bleibt aufgrund regionaler Gegebenheiten die Verfügbarkeit frischer Seren für derartige Testverfahren oftmals lediglich eine theoretische Forderung, die sich in der Praxis kaum oder nur sehr bedingt verwirklichen läßt.

4.4.2 Diagnostische Verwendbarkeit der getesteten Oligopeptide

Anhand der durchgeführten Untersuchungsreihen soll der diagnostische Wert der geprüften Oligopeptide für den ELISA beurteilt werden. Dabei ist die Reaktionsintensität eines bestimmten Antigens für dessen diagnostische Verwendbarkeit allein nicht ausschlaggebend - ja sogar bedeutungslos, falls sich zwischen den ODs der einzelnen Patientengruppen kein deutlicher Unterschied abzeichnet oder sich deren Standardabweichungen stark überschneiden (Abb. 18-21).

Es muß betont werden, daß die Auswahl der hier verwendeten Seren an die diagnostischen Befunde der Virologischen Abteilung des Instituts gebunden war und sie als reales Faktum hingenommen werden mußten. Falls die Auswahlkriterien der 4 verschiedenen Patientengruppen (Tab. 8) auf höheren Titergrenzen beruht hätten, wären beim Austesten der Antigene im ELISA durchaus deutlichere Unterschiede zwischen den entsprechenden ODs denkbar gewesen. Bei Voruntersuchungen mit EBV-Negativen eines beliebigen Alters zeigten die ODs eine derart starke Streubreite, daß die diagnostische Anwendbarkeit der hergestellten Oligopeptide sehr fraglich erschien. Erst durch eine strengere Auswahl dieser Patientengruppe, bei der das 20. Lebensjahr als Obergrenze galt, ließen sich die EBV-Negativen deutlicher gegen die übrigen Kollektive abgrenzen. Diese Beobachtung verdeutlicht, daß auch in westlichen Ländern die EBV-Antititer mit zunehmendem Alter ansteigen und im empfindlichen ELISA durch gereinigte Oligopeptide nachzuweisen sind, obwohl sie anhand der herkömmlichen Tests als "EBV-negativ" eingestuft wurden. Das unterstreicht die Bedeutung von hoch wirksamen Antigenen, die mit Hilfe der Festphasensynthese (MERRIFIELD, 1963) für die EBV-Dia-

agnostik zu gewinnen sind.

Die zugrundeliegenden Versuchsbedingungen verdeutlichen zwar bei allen Antigenen tendenzielle Unterschiede der 4 geprüften Patienten-
gruppen, sie reichen jedoch in den meisten Fällen für diagnostische
Zwecke nicht aus. Zum Teil ist dieser Mangel durch den begrenzten Meß-
bereich des Photometers (2.6) bedingt, des weiteren müßten die Verdün-
nungsstufen der Seren der Reaktionsintensität des jeweiligen Antigens
angepaßt werden; dies war bei den durchgeführten Untersuchungsrei-
hen infolge der begrenzten Mengen an produzierten Oligopeptiden aber
nur bedingt möglich. Falls beim Durchtesten eines Antigens zahlreiche
Meßwerte einen Overshoot zeigen, also außerhalb des Meßbereichs lie-
gen, müssen 1 bis 2 höhere (geometrische) Verdünnungsstufen (evtl.
noch mehr) gewählt werden. Es wäre zu erwarten, daß Reaktionsunter-
schiede oder Trends, die sich z.B. bei einer Serenverdünnung von 1/50
abzeichnen (Abb. 19), auch bei den nächst höheren Verdünnungsgraden zu
erkennen sind oder sogar deutlicher werden. Dieses Kriterium war aus
unerklärlichen Gründen für BILF1 bei einer Verdünnung von 1/200 nicht
erfüllt (vgl. Abb. 19 u. 20). Die mittlere OD der EBV-Negativen lag
unter den gleichen Versuchsbedingungen bei BILF1 in der Serenverdün-
nung 1/200 höher als bei 1/50; dieser Fall dürfte normalerweise nicht
eintreten, da unter analoger Ausführung stärkere Verdünnungen der
gleichen Seren beim selben Antigen auch zu einer niedrigeren OD im
ELISA führen müßten. Bei der Gegenüberstellung der Abb. 19 und 20
(Verteilungsdiagramme von OD-Werten beim Einsatz von IgG und einer
Serenverdünnung von 1/50 bzw. 1/200) war diese Forderung vermutlich
auch für BLLF1 (502-514) bei den NPC- und IM-Patienten nicht erfüllt;
allerdings ist hier eine eindeutige Beurteilung nicht möglich, da ei-
nige Werte oberhalb der Meßgrenze in die Mittelwertberechnung als Kon-
stante (2.6) eingingen und damit den tatsächlichen Wert etwas verzerrt
haben könnten.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die schwierige Standardisierung von
Versuchsbedingungen im ELISA. Sie wäre aber eine notwendige Vorausset-
zung für Massenkontrollen EBV-korrelierter Erkrankungen in Risikoge-
bieten; nur so könnten mit gereinigten synthetischen Antigenen bei ma-
schinell lesbaren ELISAs zuverlässige Aussagen erwartet werden. Zu-
sätzlich müßte eine Antigenproduktion von gleich hoher Qualität gesi-
chert sein (WOLF et al., 1986). Sowohl rekombinierte (MOTZ, 1986) als
auch synthetische Membranantigene dürften dafür in Frage kommen.

Durch *Staphylococcus aureus* präabsorbierte Seren konnten bei 100%

der getesteten NPC-Fälle VCA-IgA-Titer nachgewiesen werden, während sie bei der gleichen Anzahl von Normalseren fehlten (Tab. 2; PI et al., 1986; ZHU et al., 1986). Möglicherweise hätten sich in dieser Arbeit durch die SPA-Präabsorption störende Hintergrundreaktionen teilweise reduzieren und deutlichere Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen im ELISA herausstellen lassen. Gewiß müssen Verfahrensweisen gefunden werden, durch die zwischen den MA-IgA-Titern bei NPC- und Normalseren (abgelaufene EBV-Infektionen) markante Unterschiede festzustellen sind. Aufgrund großrahmig angelegter Voruntersuchungen könnten dann jene Personen ausgewählt werden, bei denen wegen verdächtiger Titer weiterführende Untersuchungen indiziert wären; so ließen sich durch das Erstellen EBV-spezifischer Antigen-Antikörper-Muster und gegebenenfalls die histologische Beurteilung von biopischem Material konkrete Befunde erheben. Auf diese Weise würden oftmals rechtzeitige prophylaktische und therapeutische Maßnahmen zur Eindämmung EBV-assoziiierter Neoplasien möglich. Synthetische und gereinigte Oligopeptide könnten bei Reihenuntersuchungen in Risikogebieten jenen Personenkreis erheblich einschränken, für den weiterführende und damit auch kostspieligere Untersuchungen in Frage kämen. Daher erlangen diese Antigene nicht nur in medizinischer, sondern auch in wirtschaftlicher Hinsicht eine erhebliche Bedeutung.

Bei den 8 Humanseren (6 NPC- und 2 EBV-negative Seren) der geometrischen Verdünnungsreihen (Abb. 22-24) lagen strengere Auswahlkriterien als für die übrigen Seren zugrunde. Es konnte gezeigt werden, daß die Karzinompatienten mit ihren ODs mehr oder weniger stark über denjenigen der EBV-Negativen lagen. Dabei erlaubten die Seren bei IgA gegen BILF1 (Abb. 22) lediglich bis zum Verdünnungsgrad 1/10 eine positive Aussage, d.h. die ODs der NPC-Seren waren noch mindestens um das 2,1fache über denjenigen der EBV-Negativen. Dagegen ließen die gleichen Seren bei IgG gegen BILF2 (Abb. 23) bis zum Verdünnungsgrad 1/10.240 eine positive Wertung zu. Das unterstreicht nochmals die unterschiedliche Reaktionsintensität der synthetisierten Oligopeptide; sie zeigte übrigens für die geometrischen Verdünnungsreihen der Kaninchenseren eine ähnliche Tendenz wie für die Verteilungsdiagramme der Humanseren. Inwieweit dies von praktischer Bedeutung sein könnte, bleibt ungeklärt.

In einer Tabelle (19) soll zusammengefaßt werden, welche Antigene anhand der durchgeführten Versuchsbedingungen und der daraus folgenden Verteilungsdiagramme für den diagnostischen Routineeinsatz in Risiko-

gebieten geeignet sein könnten. Dazu ist ein deutlicher Unterschied zwischen den gemittelten ODs der EBV-Negativen bzw. Normalseren (abgelaufene Infektionen) im Vergleich zu den NPC- und IM-Seren erforderlich. Außerdem sollten sich die entsprechenden Standardabweichungen nicht oder nur geringfügig überschneiden. Unter diesen Aspekten kann BILF1 aufgrund der Ergebnisse aus dem IgG-Block (Abb. 19) favorisiert werden. Auch im IgA-Block (Abb. 18) zeigten sich für BILF1 und BALF4 (675-688) recht günstige Verhältnisse, obwohl sich $\pm s$ bei den maßgeblichen Patientengruppen (EBV-Negative, NPC-Patienten und abgelaufene Infektionen) geringfügig überschneiden. Schließlich waren bei einer Serenverdünnung von 1/200 (Abb. 20) die genannten Kriterien eines diagnostisch einsetzbaren Antigens noch für BLLF1 (502-514) erfüllt. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß beim Verdünnungsgrad 1/200 die Normalseren nicht getestet wurden. Jedoch lagen sie für BLLF1 (502-514) bei der Verdünnungsstufe 1/50 (Abb. 19) im gleichen Bereich wie die EBV-Negativen; diese Tatsache hätte sich bei einer stärkeren Verdün-

	IgA (1/50)				IgG (1/50)				IgG (1/200)			IgM (1/50)			
	NEG	NPC	F	A	NEG	NPC	F	A	NEG	NPC	F	NEG	NPC	F	A
BLLF1 (502-514)	1,0	1,8	1,5	1,5	1,0	1,3	1,4	1,0	1,0	2,3	2,1	1,0	1,0	1,6	1,3
BLLF1 (793-805)	1,0	1,4	2,1	1,2	1,0	1,3	1,3	1,1	-	-	-	1,0	0,9	1,4	1,0
BALF4 (266-278)	1,0	1,7	1,9	1,7	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,8	2,2	1,0	0,8	1,7	1,3
BALF4 (675-688)	1,0	3,2	2,3	1,8	1,0	1,2	1,5	1,1	1,0	1,9	2,1	1,0	1,1	2,3	1,5
BILF1 (123-135)	1,0	3,5	1,8	1,3	1,0	3,7	2,4	1,3	1,0	1,4	1,5	1,0	1,4	1,6	0,9
BILF2 (48-60)	1,0	1,6	1,6	1,3	1,0	1,9	2,4	1,4	-	-	-	1,0	1,0	1,3	0,8

Tab. 19: Auf die mittlere OD der EBV-Negativen normierte Mittelwerte verschiedener Patientengruppen (vgl. Tab. 14-17). Bei den Immunglobulinen wurde die jeweilige Serenverdünnung in Klammern angegeben. Diagnostisch verwertbare Antigene sind gerastert dargestellt.

NEG: EBV-negative Seren; NPC: NPC-Seren; F: frische Infektionen; A: abgelaufene Infektionen (Normalseren).

nung unwesentlich ändern dürfen, zumal in der schwächeren Verdünnung nur jeweils 2 Seren der EBV-Negativen und Normalseren unter BLLF1 (502-514) außerhalb des Meßbereichs lagen (Abb. 19). In der IgG-Reihe (Serenverdünnung 1/200, Abb. 20) übertrafen bei 3 von 4 getesteten Antigenen die gemittelten ODs der IM-Patienten diejenigen der EBV-Negativen um mehr als das Doppelte, doch wird auch künftig für die serologische IM-Diagnose der IF-Test eine vergleichsweise größere Bedeutung haben.

4.5 VERWENDBARKEIT DER SYNTHETISIERTEN OLIGOPEPTIDE ALS VAKZINE GEGEN EBV-KORRELIERTE ERKRANKUNGEN

Können die gewonnenen Antigene aufgrund ihrer AK-Induktion als Vakzine eingesetzt werden? Diese Frage läßt sich anhand der durchgeführten Versuche nicht hinreichend beantworten: erstens wurde die Schutzfunktion der synthetischen Antigene weder bei EBV-infizierten noch EBV-empfindlichen Tieren erprobt, d.h. bei solchen, die auf eine sicher pathogene Virusdosis mit EBV-assoziierten Erkrankungen bzw. Läsionen zu reagieren vermögen; und zweitens unterblieben mit den in Kaninchen gewonnenen Antiseren Neutralisationsteste. Des weiteren wurden Anforderungen, die an eine potentielle Vakzine gestellt werden müssen, nicht überprüft. Allerdings weisen jüngste Publikationen darauf hin, daß Proteinfragmente oder synthetische Peptide aus dem EBV-Genom durchaus als Rekombinations- oder besser als Subunitvakzine verwendet werden könnten (EPSTEIN u. MORGAN, 1984; EPSTEIN et al., 1985 a u. 1985 b; MACKETT u. ARRAND, 1985; EPSTEIN u. MORGAN, 1986; WOLF, 1987). Ob Peptide hier eine ausreichende Schutzwirkung erreichen können, ist zumindest für das stark glykosilierte gp250/350 (MA BLLF1) eher fraglich. Trotzdem kann in Analogie zu HSV und Polio durchaus davon ausgegangen werden, daß auch bei ausbleibender humoraler Antwort eine protektive Immunreaktion über die selektive Stimulierung zellgebundener Mechanismen erreicht werden kann (EMINI et al., 1983).

Ein Impfstoff gegen ein onkogenes Virus darf keine virale DNA enthalten und würde am besten auf einer geeigneten Subunitvakzine basieren (EPSTEIN u. MORGAN, 1986). Das Ausmaß der Schwierigkeiten, die eine Vakzination zur langfristigen Kontrolle von EBV-Infektionen insbesondere in Risikogebieten begleiten würden, ist seit geraumer Zeit bekannt (EPSTEIN, 1976 u. 1979). Der damit verbundene Problemkreis gliedert sich in folgende Aspekte:

1. Auf welche Weise und inwieweit lassen sich die Erwartungen, die an eine EBV-Vakzine gestellt werden müssen, zunächst im Tierversuch überprüfen?
2. Welcher Personenkreis steht für eine Pilotstudie geringen Umfangs zur Verfügung und wie kann der entsprechende Impferfolg bereits nach relativ kurzer Zeit nachgewiesen werden?
3. Wann ist ein idealer und effektiver Impfzeitpunkt gegeben?
4. Mit welchem Impfprogramm läßt sich eine belastbare Schutzfunktion aufbauen und vor allem in Hochrisikogebieten über Jahre (beim BL) und Jahrzehnte (beim NPC) aufrechterhalten?
5. Welche Risikogruppen sind vornehmlich zu erfassen?
6. Welche Antigene können zur Immunisierung eingesetzt werden und wie sind diese gegebenenfalls in den erforderlichen Mengen herzustellen (WOLF, 1987)?

Für In-vivo-Studien mit EBV gilt das Lisztäffchen (*Saguinus oedipus oedipus*) als Spezies der Wahl. Durch eine Immunisierung mit MA gp350 konnten bei einem solchen Tierpaar im Rahmen eines Impfexperiments rasch spezifische Antikörper induziert werden (EPSTEIN u. MORGAN, 1986). Sobald ein hoher Antititer und eine stark Virus-neutralisierende Wirkung auftraten (1 ml Serum neutralisierte über 100.000 Lymphozyten-transformierende EBV-Einheiten), wurden den Lisztäffchen $10^{5,3}$ Lymphozyten-transformierende EBV-Einheiten verabreicht, eine Dosis, die bei 100% der ungeschützten Tiere zur Tumorbildung führt. Die immunisierten Äffchen zeigten keinerlei klinisch nachweisbare Läsionen, während ein ungeimpftes Kontrollpaar bei der gleichen Virusdosis schon nach 2 Wochen große multiple Tumoren entwickelte. Damit ließ sich beweisen, daß MA gp350 nach der Verbindung mit Liposomen und der Präparation mittels SDS-PAGE eine geeignete Subunitvakzine bei experimentell EBV-empfindlichen Tieren sein könnte. Die protektive Dosis lag für 1 ml Serum bei über 10.000 Lymphozyten-transformierenden EBV-Einheiten. Dabei ist bemerkenswert, daß das Auftreten von neutralisierenden Antikörpern per se nicht als sicheres Immunitätsmerkmal gewertet werden kann.

Im Gegensatz zur obigen Arbeit wurden die hier hergestellten Peptide aus BALF4, BLLF1, BILF1 und BILF2 vor ihrer In-vivo-Applikation nicht in Liposomen inkorporiert, sondern mit Dipalmitinsäure verestert; die Applikationsformen waren demnach verschieden. Die AK-Titer der Lisztäffchen lagen im ELISA bei 1:2.000. Die mit Oligopeptiden der

erwähnten Leserahmen immunisierten Kaninchen entwickelten unter Zuhilfenahme des Freund'schen Adjuvans AK-Titer bis 1:100.000. Dazu wünschenswerte Neutralisationsteste stehen noch aus. Mit ihrer Hilfe ließe sich nach einer entsprechenden Präparation der protektive Effekt von in vivo gewonnenen Antikörpern kontrollieren.

Die dargelegte Gegenüberstellung der EBV-spezifischen Antikörper-Induktion bei 2 verschiedenen Spezies erlaubt folgendes Resümee:

Durch die Computeranalyse offener Leserahmen lassen sich Merkmale Membran-assoziiierter Proteine charakterisieren. Das ermöglicht die anschließende In-vitro-Synthese von Oligopeptiden, die Segmente aus den entsprechenden Proteinen darstellen und starke antigene Eigenschaften besitzen. Unter Zuhilfenahme geeigneter Carrier und Adjuvantien lassen sich durch synthetische Oligopeptide im Tier hohe spezifische Antikörper erzielen, die homologes Virusmaterial neutralisieren können. Als mögliche Vakzine kommt in erster Linie das MA-BLLF¹ in Frage (WOLF, 1987). Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß mit Computerprogrammen die Identifizierung und Charakterisierung antigener Bereiche auf EBV-Membranproteinen gelungen ist und bei sorgfältiger Auswahl der Epitope eine wichtige Voraussetzung zur Festphasensynthese entsprechender Regionen geschaffen wurde. Auf dieser Basis dürften in naher Zukunft EBV-spezifische Subunitvakzine zu entwickeln sein. Von den hergestellten Oligopeptiden könnten nach weiterführenden Untersuchungen - vor allem an EBV-infizierbaren Tieren - durchaus noch einige für die Entwicklung eines EBV-Impfstoffes in Frage kommen.

Allerdings muß dem entgegengehalten werden, daß durch die In-vitro-Synthese kurzkettiger Antigene Zusatzkomponenten, wie z.B. Zuckergruppen, nicht erfaßt werden, die aber für den immunogenen Charakter überaus bedeutsam, ja sogar unentbehrlich sein können. So läßt sich die gewünschte Schutzfunktion - wie Tierexperimente gezeigt haben - oftmals nur unter Zuhilfenahme stark wirksamer Adjuvantien erreichen. Diese steigern aber nicht nur den antigenen Effekt, sondern besitzen häufig bedenkliche toxische Nebenwirkungen, die über Allergien bis hin zum anaphylaktischen Schock mit lebensbedrohlicher Symptomatik reichen können (MAYR, persönliche Mitteilung). Daher wird die Anwendbarkeit synthetischer Vakzine im wesentlichen von indifferenten Zusatzstoffen abhängen; mit ihnen muß eine protektive Impfdosis ohne toxische Nebenwirkungen zu erreichen sein. Nur wenn derartige Pharmaka verfügbar werden, ist in der Humanmedizin bei EBV-bedingten Erkrankungen an weiterführende Impfstudien zu denken.

Nach einer gelungenen Immunisierung von Lisztäffchen wäre mit den betreffenden Antigenen bei einem sorgfältig ausgewählten Personenkreis eine Pilotstudie durchzuführen. Die Wirksamkeit eines geeigneten Immunogens könnte zunächst einmal anhand einer Auswahlgruppe 15-25jähriger in westlichen Ländern überprüft werden; bei diesen Personen besteht das Risiko einer verzögerten und natürlichen EBV-Primärinfektion, die in ca. 50% der Fälle klinische Symptome der IM zeigt (NIEDERMAN et al., 1970). Im Rahmen dieser Studie könnte sich ein Impferfolg binnen weniger Jahre feststellen lassen.

Weiterführend ließen sich in Regionen mit einer erhöhten BL- oder NPC-Inzidenzrate, wo primäre EBV-Infektionen sehr früh (bis zum 4. Lebensjahr) auftreten, innerhalb des ersten Lebensjahrs umfassende Impfprogramme bei Säuglingen durchführen; damit wäre vor allem jener Zeitpunkt erfaßt, zu dem EBV-spezifische maternale Antikörper nur noch in ungenügender Menge vorliegen oder gänzlich fehlen. Bei evtl. erforderlichen Revakzinationen müßte der gleiche Personenkreis erneut behandelt werden, was in Entwicklungsländern mit gewissen Schwierigkeiten verbunden sein dürfte. Der Erfolg derartiger Präventivmaßnahmen wäre beim BL ca. nach einem Jahrzehnt zu beurteilen, da seine maximale Inzidenz etwa im 7. Lebensjahr liegt (EPSTEIN u. MORGAN, 1986). Für eine Feldstudie würden sich einige Regionen im tropischen Afrika mit einem entsprechend hohen BL-Vorkommen anbieten (BURKITT, 1963).

Beim NPC, das überwiegend eine Erkrankung des mittleren und höheren Lebensalters darstellt (SHANMUGARATNAM, 1971), müßte ein Impfschutz über Jahrzehnte aufrechterhalten bleiben, um einen Effekt nach ungefähr einer Generation beurteilen zu können. Selbst wenn geeignete Subunitvakzine verfügbar werden, dürfte in der Erhaltung protektiver AK-Titer durch Auffrischungsimpfungen bei vornehmlich Gefährdeten das Hauptproblem liegen. Aber nur so kann durch eine Vakzine das NPC in Südchina unter Kontrolle gehalten werden. Dort stellt es immerhin 23% aller Neoplasien des Menschen dar (WOLF, 1987).

5 ZUSAMMENFASSUNG

=====

Durch ein Computer-Programm, das die Sekundärstruktur von Proteinen voraussagt und sie mit zusätzlichen Parametern wie Hydrophilizität, Oberflächenwahrscheinlichkeit und Flexibilität überlagert, wurden 4 offene Leserahmen (BALF⁴, BLLF¹, BILF¹ und BILF²) im EBV-Genom identifiziert, die als Membranproteine in Frage kommen. Aus den Aminosäuresequenzen dieser Proteine wurden 6 Oligopeptide mit potentiellen antigenen Eigenschaften ausgewählt; sie umfassen zwischen 12 und 14 Aminosäuren. Die ausgewählten Regionen wurden in einem vollautomatisierten Verfahren, das auf den Prinzipien der Festphasensynthese nach MERRIFIELD (1963) beruht, hergestellt. Bei den jeweiligen Peptiden war ca. ein Drittel der Rohgewichte zur Gewinnung von Antisera in Kaninchen bestimmt; hierzu wurde im Handsynthese-Verfahren an das NH₂-Ende ein Dipalmitinsäure-Konjugat (-Gly-Gly-Lys-Di-PS) als Carrier (Trägersubstanz) angekoppelt.

Im ELISA wurden 4 Gruppen von Humansera (EBV-Negative, NPC-Patienten, frische und abgelaufene Infektionen) auf Antikörper der Klassen IgA, IgG und IgM gegen die einzelnen Peptide getestet und die jeweiligen Ergebnisse als optische Dichten (ODs) in Verteilungsdiagrammen dargestellt. Die gemittelten ODs der NPC- und IM-Sera erreichten bei IgA und IgG stets erhöhte Antititer gegenüber denjenigen der EBV-Negativen. Beim Testen von IgM-Antikörpern lagen für jedes Antigen die Werte der IM-Patienten höher als die der übrigen Patientengruppen. Unter den zugrundeliegenden Versuchsbedingungen ließ sich beweisen, daß zur Reihenuntersuchung EBV-bedingter Neoplasien in Risikogebieten BLLF¹ (502-514), BALF⁴ (675-688) und BILF¹ (123-135) von diagnostischem Nutzen sein könnten.

Mit 6 NPC- und 2 EBV-negativen Sera wurden im ELISA geometrische Verdünnungsreihen (1/10 bis 1/10.240) bei 3 verschiedenen Immunglobulinen gegen die entsprechenden Peptide durchgeführt. Die Einzelwerte sind für IgA und IgG dargestellt worden und verdeutlichten eine unterschiedliche Reaktionsintensität der getesteten Oligopeptide. Mit zunehmendem Verdünnungsgrad näherten sich die ODs der NPC-Sera denjenigen der EBV-negativen asymptotisch an.

Zur Immunisierung von Kaninchen wurden die jeweiligen Antigene mit Freund'schem Adjuvans versetzt. Nach 4 Auffrischungsimpfungen im 3-wöchigen Intervall waren hochtitrige Antisera (1/20.000 bis 1/100.000)

gegen die einzelnen Peptide nachzuweisen. Es wurde diskutiert, ob künftig synthetische Proteinfragmente aus dem EBV-Genom als Subunitvakzine in Frage kommen könnten.

Die in vivo gewonnenen monospezifischen Antikörper waren anhand entsprechender EB-viraler Proteine in Western Blots nicht zu identifizieren; jedoch gelang dies mit Ausnahme der anti-BILF2- respektive anti-BLLF1-Seren in Immunfluoreszenzen bzw. Immunpräzipitaten.

6 SUMMARY

=====

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EPSTEIN-BARR VIRAL MEMBRANE PROTEINS BY SYNTHETIC OLIGOPEPTIDES

Using a computer program which predicts the secondary structure of proteins and superimposes those with additional values such as hydrophilicity, surface probability and flexibility, 4 open reading frames (BALF4, BLLF1, BILF1 and BILF2), thought to be potential membrane proteins, were identified in the EBV genome. From the amino acid sequences of these proteins 6 oligopeptides with good antigenic characteristics were selected; they cover 12 to 14 amino acids. The selected peptides were synthesized in a full-automatic process based on the principles of the solid phase peptide synthesis by MERRIFIELD (1963). About a third of the yield from the respective peptides was used to induce antibodies production in rabbits; for this process a dipalmitic acid conjugate (-Gly-Gly-Lys-di-PA) was coupled to the NH₂-terminal ends as carrier in a manual synthesizer.

In ELISA tests 4 groups of human sera (EBV negatives, NPC patients, fresh and past EBV infections) were tested for antibodies of the classes IgA, IgG and IgM against the individual peptides and the respective results were shown as optical densities (ODs) in distribution diagrams. The NPC and IM sera always obtained elevated antibody titres in the subclasses of IgA and IgG compared to those of the EBV negative individuals. The IgM values of the IM patients for each antigen were higher than those of the other groups. Among the basic test conditions it was possible to show that the peptides derived from BLLF1 (502-514), BALF4 (675-688) and BILF1 (123-135) could be of diagnostic use for screening EBV-correlated neoplasias in high risk areas.

With 6 NPC and 2 EBV negative sera geometric dilution series (1/10 to 1/10.240) were performed for 3 different immunoglobulin classes in ELISA assays against the peptides. The values for IgA and IgG were figured and emphasized a different reaction intensity of the tested oligopeptides. By increasing the percentage of dilution the ODs of the NPC sera approached asymptotically those of the EBV negatives.

For the inoculation of rabbits the respective antigens were mixed with Freund's adjuvant. After 4 booster injections in intervals of 3 weeks high-titered antisera (1/20.000 to 1/100.000) against the indi-

vidual peptides could be obtained. It was discussed whether in future synthetic peptides derived from the EBV proteins could be considered as subunit vaccines.

In Western blots the corresponding EB-viral proteins could not be identified by monospecific antisera obtained *in vivo*; however, this was possible in immunofluorescences or immunoprecipitates with the exception of the anti-BILF2/ anti-BLLF1 sera.

7 L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

ABRESCH, H.L., u. C. HORNING (1986):

ß-Interferon-Behandlung dreier Patienten mit Nasopharynxcarcinom.
HNO-Klinik Krankenhaus Köln-Hohweide, 1-9, unveröffentlicht

ALBERTI, W., G. SCHMITT, M. BAMBERG u. U. SCHULZ (1984):

Ergebnisse der perkutanen Strahlentherapie fortgeschrittener und
inkomplett operierter Epipharynxkarzinome.

In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.
Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 87-89

APPLIED BIOSYSTEMS GmbH, Pfungstadt (1984 a):

A new approach to automated peptide synthesis.
Applied Biosystems GmbH, Pfungstadt

APPLIED BIOSYSTEMS GmbH, Pfungstadt (1984 b):

Model 430 A peptide synthesizer.
Applied Biosystems GmbH, Pfungstadt

APPLIED BIOSYSTEMS GmbH, Pfungstadt (1985):

The advanced method for peptide synthesis: pre-formed symmetric
anhydrides.

Applied Biosystems GmbH, Pfungstadt

BAER, R., A.T. BANKIER, M.D. BIGGIN, P.L. DEININGER, P.C. FARRELL,
T.J. GIBSON, G. HATFULL, G.S. HUDSON, S.C. SATCHWELL, C. SEGUN, P.S. TUFFNELL u. B.G. BARRELL (1984):

DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome.

Nature 310, 207-211

BAYLISS, G.J., u. H. WOLF (1980):

Epstein-Barr virus induced cell fusion.
Nature (London) 287, 164-165

BAYLISS, G.J., u. H. WOLF (1981):

The spontaneous and induced synthesis of Epstein-Barr virus anti-
gens in Raji cells immobilized on surfaces coated with anti-lympho-
cyte globulin.

J. gen. Virol. 54, 397-401

BECKER, Y., u. A. WEINBERG (1971):

Burkitt lymphoblasts and their Epstein-Barr virus. Synthesis of
viral DNA and proteins in arginine deprived cells.

Isr. J. Med. Sci. 7, Nr. 4, 561-567

BIRNBOIM, H.C. (1982):

DNA strand breakage in human leukocytes exposed to a tumor pro-
motor phorbol myristate acetate.

Science 215, 1247-1249

BODEMANN, H.H. (1984):

Chemotherapie des metastasierenden Nasopharynxkarzinoms.

In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.

Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 174-179

- BÜTTCHER, H.D., A. SCHADEL, U. HAVERKAMP, W. WAGNER u. M. SCHMILOWSKI (1984):
Prognose der Nasopharynx-tumoren in Abhängigkeit von der histologischen Klassifikation.
In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.
Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 83-86
- BORNKAMM, G.W. (1984):
Virologisch-serologische Diagnostik des Nasopharynxkarzinoms.
In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.
Urban & SCHWARZENBERG, München-Wien-Baltimore, 15-21
- BURKITT, D. (1958):
A sarcoma involving the jaws in African children.
Br. J. Surg. 46, 218-223
- BURKITT, D. (1963):
A lymphoma syndrome in tropical Africa.
In: RICHTER, G.W., u. M.A. EPSTEIN (Hrsg.): International Review of Experimental Pathology.
Academic Press, New York, 2, 67-138
- BURKITT, D. (1969):
Etiology of Burkitt's lymphoma - an alternative hypothesis to a vectored virus.
J. Natl. Cancer Inst. 42, 19-28
- BURKITT, D., u. D.H. WRIGHT (1970):
Burkitt's lymphoma.
Livingstone, Edinburgh
- CHOU, P.J., u. G.D. FASMAN (1974 a):
Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet and random coil regions.
Biochemistry 13, 211-222
- CHOU, P.J., u. G.D. FASMAN (1974 b):
Prediction of protein conformation.
Biochemistry 13, 222-245
- CHOU, P.J., u. G.D. FASMAN (1978):
Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence.
Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47, 45-148
- COATES, H.L., G. PEARSON, H.B. NEEL, L.H. WEILAND u. K.D. DEVINE (1978):
An immunologic basis for detection of occult primary malignancies of the head and neck.
Cancer 41, 912-918
- COHEN, G.H., B. DIETZSCHOLD, M. PONCE de LEON, D. LONG, E. GOLUB, A. VARRICHIO, L. PEREIRA u. R.J. EISENBERG (1984):
Localization and synthesis of an antigenic determinant of Herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibody.
J. Virol. 49, Nr. 1, 102-108

DAVIDSOHN, I., u. C.L. LEE (1969):

The clinical serology of infectious mononucleosis.

In: CARTER, R.L., u. H.G. PENMAN (Hrsg.): Infectious Mononucleosis.

Blackwell, Oxford, 177-200

DESGRANGES, C., G. de-THÉ, J.H.C. HO u. R. ELLONZ (1977):

Neutralizing EBV-specific IgA in throat washings of nasopharyngeal carcinoma (NPC) patients.

Int. J. Cancer 19, 627-633

de-THÉ, G., A. GESER, N.E. DAY, P.M. TUKEI, E.H. WILLIAMS, D.P. BERI, P.G. SMITH, A.G. DEAN, G.W. BORNKAMM, P. FEORINO u. W. HENLE (1978):

Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. Nature 274, 756-761

de-THÉ, G., u. Y. ZENG (1986):

Population screening for EBV markers: toward improvement of nasopharyngeal carcinoma control.

In: EPSTEIN, M.A., u. B.G. ACHONG (Hrsg.): The Epstein-Barr Virus - Recent Advances.

William Heinemann Medical Books, London, 237-249

DIETZ, R., H.J. WILHELM u. G. SCHWARZE (1984):

Radiologisch-zytostatische Kombinationsbehandlung bei fortgeschrittenen Nasopharynxkarzinomen und -rezidiven.

In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.

Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 180-183

DÜHRMANN, D., u. Ch. SCHEELE (1986):

Milzruptur bei infektiöser Mononukleose.

In: STRAUBE, D. (Hrsg.): Klinikarzt.

Perimed Verlag, Erlangen, 5, 350-354

DOSCHER, M.S. (1977):

Solid-phase peptide synthesis.

Methods Enzymol. 47, 578-617

DÜHMKE, E., W. CALIEBE u. E.-W. SCHWARZE (1984):

Ergebnisse der Strahlenbehandlung von lymphoepithelialen und undifferenzierten Karzinomen des Nasen- und Mundrachens.

In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.

Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 69-78

EDSON, C.M., u. D.A. THORLEY-LAWSON (1983):

Synthesis and processing of the three major envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus.

J. Virol. 46, 547-556

EINHORN, L., u. I. ERNBERG (1978):

Induction of EBNA precedes stimulation of DNA-synthesis in EBV-infected human lymphocytes.

Int. J. Cancer 21, 157-160

EMINI, E.A., J.V. HUGHES, D.S. PERLOW u. J. BOGNER (1985):

Induction of Hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide.

J. Virol. 55, 836-839

- EMINI, E.A., B.A. JAMESON u. E. WIMMER (1983):
Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing anti-
bodies by synthetic peptides.
Nature (London) 304, 699-703
- EPSTEIN, M.A. (1976):
Epstein-Barr virus - is it time to develop a vaccine program?
J. Natl. Cancer Inst. 56, 697-700
- EPSTEIN, M.A. (1979):
Vaccine control of EB virus-associated tumors.
In: EPSTEIN, M.A., u. B.C. ACHONG (Hrsg.): The Epstein-Barr Virus.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 439-448
- EPSTEIN, M.A., u. B.G. ACHONG (1979):
The relationship of the virus to Burkitt's lymphoma.
In: EPSTEIN, M.A., u. B.G. ACHONG (Hrsg.): The Epstein-Barr Virus.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 321-337
- EPSTEIN, M.A., B.G. ACHONG u. Y.M. BARR (1964):
Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma.
Lancet 1, 702-703
- EPSTEIN, M.A., u. A.J. MORGAN (1984):
Oncogenic role of Epstein-Barr virus: progress towards a subunit
vaccine.
In: GOLDMAN, J.M., u. O. JARRETT (Hrsg.): Mechanisms of Viral
Leukaemogenesis.
Churchill Livingstone, Edinburgh, 184-206
- EPSTEIN, M.A., u. A.J. MORGAN (1986):
Progress with subunit vaccines against the virus.
In: EPSTEIN, M.A., u. B.G. ACHONG (Hrsg.): The Epstein-Barr Virus
- Recent Advances.
William Heinemann Medical Books, London, 271-289
- EPSTEIN, M.A., A.J. MORGAN, S. FINERTY, B.J. RANDLE u. J.K.
KIRKWOOD (1985 a):
Protection of cottontop tamarins against Epstein-Barr virus indu-
ced malignant lymphoma by a prototype subunit vaccine.
Nature 318, 287-289
- EPSTEIN, M.A., B.J. RANDLE, S. FINERTY, J.K. KIRKWOOD u. A.J. MORGAN
(1985 b):
Not all vaccine-induced EB virus-neutralizing antibodies protect
susceptible animals.
Clin. Exp. Immunol., im Druck
- ERNBERG, I., u. G. KLEIN (1979):
EB virus-induced antigens.
In: EPSTEIN, M.A., u. B.G. ACHONG (Hrsg.): The Epstein-Barr Virus.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 39-60
- ERNBERG, I., G. KLEIN, F.M. KOURILSKY u. D. SILVESTRE (1974):
Differentiation between early and late membrane antigen on human
lymphoblastoid cell lines infected with Epstein-Barr virus.
I. Immunofluorescence.
J. Natl. Cancer Inst. 53, 61-65

- ERNBERG, I., G. MASUCCI u. G. KLEIN (1976):
Persistence of Epstein-Barr viral nuclear antigen (EBNA) in cells entering the EB viral cycle.
Int. J. Cancer 17, 197-203
- EVANS, A.S. (1982 a):
Epidemiology of Epstein-Barr virus infection and disease.
In: NAHMIA, A., W. DOWDLE u. R. SCHINAZI (Hrsg.): Human Herpes-viruses.
Elsevier North Holland, Inc., 172-183
- EVANS, A.S. (1982 b):
The Transmission of EB viral infections.
In: HOOKS, J., u. G. JORDAN (Hrsg.): Viral Infections in Oral Medicine.
Elsevier North Holland, 211-225
- FLEISHER, G., E.T. LENNETTE, G. HENLE u. W. HENLE (1979):
Incidence of heterophil antibody responses in children with infectious mononucleosis.
J. Pediatr. 94, Nr. 5, 723-728
- FROHNE, D., u. U. JENSEN (1973):
Euphorbiaceae.
In: FROHNE, D., u. U. JENSEN: Systematik des Pflanzenreichs unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen.
Fischer Verlag, Stuttgart, 165-167
- GARNIER, J., D.J. OSGUTHORPE u. B. ROBSON (1978):
Analysis of the accuracy and implication of simple methods for predicting secondary structure of globular proteins.
J. Mol. Biol. 120, 97-120
- GERBER, P., F.K. NKUMAH, R. PRITCHETT u. E. KIEFF (1976):
Comparative studies of Epstein-Barr virus strains from Ghana and the United States.
Int. J. Cancer 17, 71-81
- GERBER, P., M. NONOYAMA, S. LUCAS, E. PERLIN u. L.I. GOLDSTEIN (1972):
Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis.
Lancet 2, 988-989
- GERGELY, L., G. KLEIN u. I. ERNBERG (1971):
Host cell macromolecular synthesis in cells containing Epstein-Barr virus (EBV)-induced early antigens, studied by combined immunofluorescence and radioautography.
Virology 45, Nr. 1, 22-29
- GONG, M., T. OOKA, T. MATSUO u. E. KIEFF (1987):
Epstein-Barr virus glycoprotein homologous to herpes simplex virus gB.
J. Virol. 61, 2, 499-508

HAAGEN, E. (1974):

Infektiöse Mononukleose - Hepatitis-Gruppe.

In: HAAGEN, E. (Hrsg.): Viruskrankheiten des Menschen.
Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2, 1176-1227

HENDERSON, A., S. RIPLEY, M. HELLER u. E. KIEFF (1983):

Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, Nr. 7, 1987-1991

HENLE, G., u. W. HENLE (1966):

Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma.

J. Bacteriol. 91, 1248-1256

HENLE, G., u. W. HENLE (1976):

Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma.

Int. J. Cancer 17, 1-7

HENLE, G., u. W. HENLE (1979):

The virus as the etiologic agent of infectious mononucleosis.

In: EPSTEIN, M.A., u. B.G. ACHONG (Hrsg.): The Epstein-Barr Virus.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 297-320

HENLE, G., W. HENLE u. C.A. HORWITZ (1974):

Antibodies to Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in infectious mononucleosis.

J. Infect. Dis. 130, 231-239

HENLE, G., W. HENLE u. G. KLEIN (1971 a):

Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus infected cells.

Int. J. Cancer 8, 272-282

HENLE, G., W. HENLE, G. KLEIN, P. GUNVÉN, P. CLIFFORD, R.H. MORROW u. J.L. ZIEGLER (1971 b):

Antibodies to early Epstein-Barr virus-induced antigens in Burkitt's lymphoma.

J. Natl. Cancer Inst. 46, 861-871

HENLE, W., u. G. HENLE (1969):

The relation between the Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma and cancer of the postnasal space.

East Afr. Med. J. 46, 402-406

HENLE, W., u. G. HENLE (1978):

The immunological approach to study of possibly virus-induced human malignancies using the Epstein-Barr virus as example.

In: HOMBURGER, F. (Hrsg.): Progress in Experimental Tumor Research.

Karger Verlag, Basel, 19-48

HENLE, W., u. G. HENLE (1979):

Seroepidemiology of the virus.

In: EPSTEIN, M.A., u. B.G. ACHONG (Hrsg.): The Epstein-Barr Virus.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 61-78

HENLE, W., u. G. HENLE (1980):

Consequences of persistent Epstein-Barr virus infections.
In: ESSEX, M., G. TODARO u. H. zur HAUSEN (Hrsg.): Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation: Viruses in Naturally Occurring Cancers.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 7, 3-10

HENLE, W., u. G. HENLE (1982):

Immunology of Epstein-Barr virus.
In: ROIZMAN, B. (Hrsg.): The Herpesviruses.
Plenum Publishing Corporation 1, 209-252

HENLE, W., G. HENLE u. E.T. LENNETTE (1979):

The Epstein-Barr virus - It is perhaps the commonest of all the viruses that infect human beings. It is the cause of infectious mononucleosis, and there is substantial evidence linking it with two types of human cancer.
Sci. Am. 241, Nr. 1, 48-59

HENLE, W., G. HENLE, B. ZAJAC, G. PEARSON, R. WAUBKE u. M. SCRIBA (1970):

Differential reactivity of human sera with early antigens induced by Epstein-Barr virus.
Science 169, 188-190

HENLE, W., K. HUMMELER u. G. HENLE (1966):

Antibody coating and agglutination of virus particles separated from the EB-3 line of Burkitt lymphoma cells.
J. Bacteriol. 92, 269-271

HEWETSON, J.F., G. ROCCHI, W. HENLE u. G. HENLE (1973):

Neutralizing antibodies against Epstein-Barr virus in healthy populations and patients with infectious mononucleosis.
J. Infect. Dis. 128, 283-289

HO, J.H.C. (1972):

Nasopharyngeal carcinoma (NPC).
Adv. Cancer Res. 15, 57-92

HOPP, T.P. (1981):

A synthetic peptide with hepatitis B surface antigen reactivity.
Molec. Immunol. 18, 869-872

HOPP, T.P. (1984):

Immunogenicity of a synthetic HBsAg peptide. Enhancement by conjugation to a fatty acid carrier.
Molec. Immunol. 21, Nr. 1, 13-16

HOPP, T.P., u. K.R. WOODS (1981):

Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3824-3828

HORWITZ, C.A., W. HENLE, G. HENLE, H. POLESKY, H.H.(Jr.) BALFOUR, R.A. SIEM, S. BORKEN u. P.C.J. WARD (1977):

Heterophil-negative infectious mononucleosis and mononucleosis-like illness: laboratory confirmation of 43 cases.
Am. J. Med. 63, 947-956

- HUANG, D.P., J.H.C. HO, W. HENLE u. G. HENLE (1974):
Demonstration of Epstein-Barr virus associated nuclear antigen in nasopharyngeal carcinoma cells from fresh biopsies.
Int. J. Cancer 14, 580-588
- HUMMEL, M., D. THORLEY-LAWSON u. E. KIEFF (1984):
An Epstein-Barr virus DNA fragment encodes messages for the two major envelope glycoproteins (gp 350/300 and gp 220/200).
J. Virol. 49, Nr. 2, 413-417
- ITO, Y. (1986):
Vegetable activators of the viral genome and the causation of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma.
In: EPSTEIN, M.A., u. B.G. ACHONG (Hrsg.): The Epstein-Barr Virus - Recent Advances.
William Heinemann Medical Books, London, 207-236
- ITO, Y., M. KISHISHITA, S. YANASE u. T. HARAYAMA (1981):
Epstein-Barr virus-activating principles in medicinal plants.
In: SHIOTA, H., Y.-C. CHENG u. W.H. PRUSOFF (Hrsg.):
Herpesvirus. Clinical, pharmacological and basic aspects.
Proceedings of an International Symposium.
Excerpta Medica, Amsterdam
- JAMESON, B., u. H. WOLF (1986):
Predicting antigenicity from protein primary structure:
A new algorithm for the prediction of antigenic sites.
Manuskript in Vorbereitung
- JILG, W., u. H. WOLF (1985):
Diagnostic significance of antibodies to the Epstein-Barr virus-specific membrane antigen gp 250.
J. Infect. Dis. 152, Nr. 1, 222-225
- JONDAL, M. (1976):
Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against Epstein-Barr virus-determined antigens. I. Reactivity in sera from normal persons and from patients with acute infectious mononucleosis.
Clin. Exp. Immunol. 25, 1-10
- JONDAL, M., E. SVEDMYR, E. KLEIN u. S. SINGH (1975):
Killer T cells in a Burkitt's lymphoma biopsy.
Nature 255, 405-407
- KAISER, E., R.L. COLESCOTT, C.D. BOSSINGER u. P.J. COOK (1970):
Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides.
Anal. Biochem. 34, 595-598
- KARPLUS, P.A., u. G.E. SCHULZ (1985):
Prediction of chain flexibility in proteins. A tool for the selection of peptide antigens.
Naturwissenschaften 72, 212-213
- KARSTENS, H.J., J. AMMON u. R. MERTENS (1984):
Metastasierungsverhalten des Nasopharynxkarzinoms - Aktuelle diagnostische und therapeutische Konsequenzen.
In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.
Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 105-113

- KIEFF, E., T. DAMBAUGH, M. HELLER, W. KING, A. CHEUNG, V. van SANTEN, M. HUMMEL, C. BEISEL, S. FENNEWALD, K. HENNESSY u. T. HEINEMAN (1982):
The biology and chemistry of Epstein-Barr virus.
J. Infect. Dis. 146, Nr. 4, 506-517
- KLEIN, G. (1979):
The relationship of the virus to nasopharyngeal carcinoma.
In: EPSTEIN, M.A., u. B.G. ACHONG (Hrsg.): The Epstein-Barr Virus.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 339-350
- KLEIN, G., P. CLIFFORD, E. KLEIN, R.T. SOUTH, J. MINOWADA, F. KOURILSKY u. J.H. BURCHENAL (1967):
Membrane immunofluorescence reactions of Burkitt lymphoma cells from biopsy specimens and tissue cultures.
J. Natl. Cancer Inst. 39, 1027-1044
- KLEIN, G., P. CLIFFORD, E. KLEIN u. J. STJERNSWÄRD (1966):
Search for tumor specific immune reactions in Burkitt lymphoma patients by the membrane immunofluorescence reaction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 1628-1635
- KLEIN, G., G. PEARSON, G. HENLE, W. HENLE, V. DIEHL u. J.C. NIEDERMAN (1968 a):
Relation between Epstein-Barr viral and cell membrane immunofluorescence in Burkitt tumor cells. II. Comparison of cells and sera from patients with Burkitt's lymphoma and infectious mononucleosis.
J. Exp. Med. 128, 1021-1030
- KLEIN, G., G. PEARSON, J.S. NADKARNI, J.J. NADKARNI, E. KLEIN, G. HENLE, W. HENLE u. P. CLIFFORD (1968 b):
Relation between Epstein-Barr viral and cell membrane immunofluorescence of Burkitt tumor cells. I. Dependence of cell membrane immunofluorescence on presence of EB virus.
J. Exp. Med. 128, 1011-1102
- KLEIN, G., E. SVEDMYR, M. JONDAL u. P.O. PERSSON (1976):
EBV-determined nuclear antigen (EBNA)-positive cells in the peripheral blood of infectious mononucleosis patients.
Int. J. Cancer 17, 21-26
- KRÜGER, G., u. G. BERTRAM (1984):
Klassifikation und klinisch-pathologische Korrelation des Nasopharynxkarzinoms.
In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.
Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 8-14
- KRÜGER, G., S. KOTTARIDIS, H. WOLF, D. ABLASHI, K. SESTERHENN u. G. BERTRAM (1981):
Histological types of nasopharyngeal carcinoma as compared to EBV serology.
Anticancer Res. 1, 187-194
- KRÜGER, G., u. J. WUSTROW (1981):
Current histological classification of nasopharyngeal carcinoma at Cologne university.
Cancer Campaign 5, 11-15

- KUTZNER, J., B. BORNHOFEN u. A. RÜSLER (1984):
Kobalt-60-Strahlentherapie von Nasopharynx-Tumoren 1963 bis 1979.
In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.
Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 79-82
- LANGE, B., A. ARBETER, J. HEWETSON u. W. HENLE (1978):
Longitudinal study of Epstein-Barr virus antibody titers and excretion in patients with Hodgkin's disease.
Int. J. Cancer 22, 521-527
- LEMON, S.M., L.M. HUTT, J.E. SHAW, J.-L. LI u. J.S. PAGANO (1977):
Replication of EBV in epithelial cells during infectious mononucleosis.
Nature (London) 268, 268-270
- LERNER, R.A. (1983):
Synthetic vaccines - A short chain of amino acids assembled in the laboratory to mimic a site on the surface of a viral protein can give rise to antibodies of predetermined specificity that confer immunity against the virus.
Sci. Am. 248, Nr. 2, 66-74
- LERNER, R.A., N. GREEN, H. ALEXANDER, F.-T. LIU, J.G. SUTCLIFFE u. T.M. SHINNICK (1981):
Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, Nr. 6, 3403-3407
- LIN, J.C., M.C. SMITH u. J.S. PAGANO (1983):
Activation of latent Epstein-Barr virus genomes: selective stimulation of synthesis of chromosomal proteins by a tumor promotor.
J. Virol. 45, Nr. 3, 985-991
- LIU, F.T., M. ZINNECKER, T. HAMAOKA u. D.H. KATZ (1979):
New procedures for preparation and isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of D-amino acids and immunochemical characterization of such conjugates.
Biochemistry 18, Nr. 4, 690-693
- LUKA, J., B. KALLIN u. G. KLEIN (1978):
Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate.
J. Gen. Virol. 40, 511-521
- MACKETT, M., u. J.R. ARRAND (1985):
Recombinant vaccinia virus induces neutralising antibodies in rabbits against Epstein-Barr virus membrane antigen gp 340.
EMBO J. 4, 3229-3234
- MAYR, A. (1986):
Entwicklung von Schutzimpfungen gegen virusbedingte Tumoren.
In: Der Praktische Tierarzt.
Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei, Hannover, 9, 753-760
- MERRIFIELD, R.B. (1963):
Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide.
J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154

- MERTENS, R., J.H. KARSTENS, J. AMMON, H.W. CLASSEN u. Ch. MITTERMAYER (1984):
Bisherige Erfahrungen der Interferontherapie an 7 Patienten mit Nasopharynxkarzinom.
In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.
Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 188-193
- MILLER, G. (1985):
Epstein-Barr virus.
In: FIELDS, B.N. et al. (Hrsg.): Virology.
Raven Press, New York, 563-589
- MODROW, S. (1983):
Genexpression lymphotroper Herpesviren nichtmenschlicher Primaten: Herpesvirus saimiri und Herpesvirus ateleles.
München, LMU, Fachber. Biologie, Diss.
- MODROW, S., B.H. HAHN, G.M. SHAW, R.C. GALLO, F. WONG-STAAAL u. H. WOLF (1987 a):
Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: Prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions.
J. Virol. 61, 2, 570-578
- MODROW, S., K. KLEINHANS, M. MARSCHALL, B. HÜFLACHER u. H. WOLF (1987):
Use of synthetic oligopeptides for the identification and characterization of Epstein-Barr viral membrane proteins.
In Vorbereitung
- MODROW, S., u. H. WOLF (1986):
Characterization of two related Epstein-Barr virus-encoded membrane proteins that are differentially expressed in Burkitt lymphoma and in vitro-transformed cell lines.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5703-5707
- MORGAN, D.G., J.C. NIEDERMAN, G. MILLER, H.W. SMITH u. J.M. DOWALIBY (1979):
Site of Epstein-Barr virus replication in the oropharynx.
Lancet 2, 1154-1157
- MOTZ, M. (1986):
Gentechnologische Herstellung Epstein-Barr viraler Proteine für Diagnostik und Prävention.
München, LMU, Fachber. Biologie, Diss.
- MOTZ, M., G. DEBY, W. JILG u. H. WOLF (1986 a):
Expression of the Epstein-Barr virus major membrane proteins in Chinese hamster ovary cells.
Gene 44, 353-359
- MOTZ, M., J. FAN, R. SEIBL, W. JILG u. H. WOLF (1986 b):
Expression of the Epstein-Barr virus 138-kDa early protein in Escherichia coli for the use as antigen in diagnostic tests.
Gene 42, 303-312
- NIEDERMAN, J.C., A.S. EVANS, L. SUBRAHMANYAN u. R.W. McCOLLUM (1970):
Prevalence, incidence and persistence of EB virus antibody in young adults.
N. Engl. J. Med. 282, 361-365

- NKRUMAH, F., W. HENLE, G. HENLE, R. HEBERMAN, V. PERKINS u. R. DEPUE (1976):
Burkitt's lymphoma: Its clinical course in relation to immunologic reactivities to Epstein-Barr virus and tumor related antigens.
J. Natl. Cancer Inst. 57, 1051-1056
- OLD, L.J., E.A. BOYSE, G. GEERING u. H.F. OETTGEN (1968):
Serologic approaches to the study of cancer in animals and man.
Cancer Res. 28, 1288-1299
- OLD, L.J., E.A. BOYSE, H.F. OETTGEN, E. de HARVEN, G. GEERING, B. WILLIAMSON u. P. CLIFFORD (1966):
Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 1699-1704
- PAUL, J.R., u. W.W. BUNNELL (1932):
The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis.
Am. J. Med. Sci. 183, 91-104
- PELLETT, P.E., M.D. BIGGIN, B. BARRELL u. B. ROIZMAN (1985):
Epstein-Barr virus genome may encode a protein showing significant amino acid and predicted secondary structure homology with glycoprotein B of herpes simplex virus 1.
J. Virol. 56, Nr. 3, 807-813
- PFEIFFER, E. (1889):
Drüsenfieber.
Jahrb. Kinderheilk. 29, 257-264
- PHARMACIA FINE CHEMICALS (1979):
Gel filtration - theory and practice
Rahms i Lund, Uppsala
- PI, G.H., Y. ZENG u. G. de-THÉ (1985):
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of nasopharyngeal carcinoma by Epstein-Barr virus IgA/EA antibodies.
Ann. Virol. Inst. Pasteur 136E, 131-140
- PI, G.H., Y. ZENG u. H. WOLF (1986):
Detection of IgA antibody to EBV membrane antigen using Staphylococcus aureus preabsorbed sera is closely associated with nasopharyngeal carcinoma.
J. Virol. Methods, im Druck
- PLIENINGER, M. (1986):
Das Nasopharynxkarzinom und seine Therapie mit Beta-Interferon.
In: HOFSCHNEIDER, P.H. (Hrsg.): Immuntherapie mit Interferon.
Zuckschwert-Verlag, München, im Druck
- PRINCE, A.M., H. IKRAM u. T.P. HOPP (1982):
Hepatitis B virus vaccine: identification of HBsAg/a and HBsAg/d but not HBsAg/y subtype antigenic determinants on a synthetic immunogenic peptide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 579-582
- PSCHYREMBEL, W. (Hrsg., 1986):
Klinisches Wörterbuch. 255. Aufl.
Walter de Gruyter, Berlin-New York

QUALTIERE, L.F., u. G.R. PEARSON (1979):

Epstein-Barr virus-induced membrane antigens: immunochemical characterization of Triton X-100 solubilized viral membrane antigens from EBV-superinfected Raji cells.
Int. J. Cancer 23, 808-817

REEDMAN, B.M., u. G. KLEIN (1973):

Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines.
Int. J. Cancer 11, 599-620

REEDMAN, B.M., G. KLEIN, J.H. POPE, M.K. WALTERS, G. HILGERS, S. SINGH u. B. JOHANSSON (1974):

Epstein-Barr virus associated complement-fixing and nuclear antigens in Burkitt's lymphoma biopsies.
Int. J. Cancer 13, 755-763

RENTSCHLER GmbH & Co., Laupheim (1986):

Fiblaferon - Große Hoffnung beim Nasopharynxkarzinom.
In: STRAUBE, D. (Hrsg.): Klinikarzt.
Perimed Verlag, Erlangen, 12, 894

RIEDWYL, H. (1978):

Angewandte mathematische Statistik in Wissenschaft, Administration und Technik.
Paul Haupt Verlag, Bern-Stuttgart

ROSSI, A., R. MOLINARI, M. NAVA, U. FELCI, M. DEL VECCHIO u. G. de PALO (1985):

Adjuvant chemotherapy with vincristine (V), cyclophosphamide (C), adriamycin (A) plus radiotherapy (RT) versus RT alone in nasopharyngeal carcinoma (NPC).
Proc. ASCO 4, 142

SCHOOLEY, R.T., u. R. DOLIN (1979):

Epstein-Barr virus (infectious mononucleosis).
In: MANDELL, G.L., R.G. DOUGLAS u. J.E. BENNETT (Hrsg.): Principles and Practice of Infectious Diseases.
John Wiley & Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto, 1324-1341

SEIBL, R. (1985):

Kartierung von Epstein-Barr Virus Proteinen auf dem Genom und Untersuchungen zu deren Expression.
München, LMU, Fachber. Biologie, Diss.

SEIBL, R., u. H. WOLF (1984):

Mapping of Epstein-Barr virus proteins on the genome by translation of hybrid-selected RNA from induced P3HR1 cells and induced Raji cells.
Virol. 141, 1-13

SHANMUGARATNAM, K. (1971):

Studies on the etiology of nasopharyngeal carcinoma.
In: RICHTER, G.W., u. M.A. EPSTEIN (Hrsg.): International Review of Experimental Pathology.
Academic Press, New York, 10, 361-413

- STARCICH, B.R., B.H. HAHN, G.M. SHAW, P.D. McNEELY, S. MODROW,
H. WOLF, E.S. PARKS, W.P. PARKS, S.F. JOSEPHS, R.C. GALLO u.
F. WONG-STAAAL (1986):
Identification and characterization of conserved and variable re-
gions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS.
Cell 45, 637-648
- STEWART, J.M., u. J.D. YOUNG (1969):
Solid Phase Peptide Synthesis.
Freeman Verlag, San Francisco
- TREUNER, J., u. D. NIETHAMMER (1984):
Behandlung des Nasopharynxkarzinoms mit Interferon.
In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.
Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 184-187
- TREUNER, J., D. NIETHAMMER, G. DANNECKER, R. HAGMANN, V. NEEF u. P.H.
HOFSCHEIDER (1980):
Successful treatment of nasopharyngeal carcinoma with interferon.
Lancet, London, 817-818
- VONKA, V., I. VLCKOVA, H. ZAVADOVA, K. KOUBA, Y. LAZONSKA u. J. DUBEN
(1972):
Antibodies to EB virus capsid antigen and soluble antigen of
lymphoblastoid cells in infectious mononucleosis.
Int. J. Cancer 9, 529-535
- WARA, W.M., D.W. WARA, T.L. PHILLIPS u. A. AMMAH (1975):
Elevated IgA in carcinoma of the nasopharynx.
Cancer 35, 1313-1315
- WOLF, H. (1983):
Biology of Epstein-Barr virus.
In: PURITILLO, D. (Hrsg.): Immune Deficiency and Cancer. Epstein-
Barr Virus and Lymphoproliferative Malignancies.
Plenus Press, New York, 233-241
- WOLF, H. (1986):
Virus-assoziierte Krebserkrankungen des Menschen.
Münch. med. Wochenschr. 128, 633-638
- WOLF, H. (1987):
The Epstein-Barr virus and related diseases.
In Vorbereitung
- WOLF, H., G.J. BAYLISS u. R. SEIBL (1984 a):
New results on the biology of Epstein-Barr virus.
In: WITTMANN, J. (Hrsg.): Latent Herpes Virus in Veterinary Medi-
cine.
Nijhoff, Boston, 75-90
- WOLF, H., G.J. BAYLISS u. E. WILMES (1981):
Biological properties of Epstein-Barr virus.
In: GRUNDMANN, E., G.R.F. KRÜGER u. D.V. ABLASHI (Hrsg.):
Nasopharyngeal Carcinoma.
Cancer Campaign 5, 101-109, Fischer Verlag, Stuttgart-New York

- WOLF, H., M. HAUS u. E. WILMES (1984 b):
Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland.
J. Virol. 51, Nr. 3, 795-798
- WOLF, H., S. MODROW, M. MOTZ, B. JAMESON, G. HERMANN u. B. FÖRTSCH (1987):
An integrated family of amino acid sequence analysis programs.
CABIOS, im Druck
- WOLF, H., M. MOTZ, R. KÜHBECK, R. SEIBL, W. JILG, G.J. BAYLISS, B. BARRELL, E. GOLUB, Y. ZENG u. S.Y. GU (1984 c):
Strategies for the preparation of Epstein-Barr virus proteins of diagnostic and protective value by genetic engineering: a new approach based on segments of virus-encoded gene products.
IARC Sci. Publ. 63, 525-539
- WOLF, H., M. MOTZ, S. MODROW, W. JILG, R. SEIBL, R. KÜHBECK, J. FAN u. Y. ZENG (1986):
Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma.
In: MUNK, K. (Hrsg.):
Contr. Oncol. 24, 13-22, Karger Verlag, Basel
- WOLF, H., u. R. SEIBL (1984):
Benign and malignant disease caused by EBV.
J. Invers. Dermatol. 83, 88-95
- WOLF, H., H. zur HAUSEN u. V. BECKER (1973):
EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells.
Nature (London) 244, 245-247
- YAO, Q.Y., A.B. RICKINSON u. M.A. EPSTEIN (1985):
A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals.
Int. J. Cancer 35, 35-42
- ZENG, Y. (1985):
Seroepidemiological studies on nasopharyngeal carcinoma in China.
Adv. Cancer Res. 44, 121-138
- ZENG, Y., C.H. GONG, M.G. JAN, Z. FUN, L.G. ZHANG u. H.Y. LI (1983):
Epstein-Barr virus IgA/EA antibody for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by immunoautoradiography.
Int. J. Cancer 31, 599-601
- ZENG, Y., S.J. SHEN, H. DENG, J.L. MA, Q. ZHANG, J.S. ZHU u. J.R. CHENG (1984):
Early nasopharyngeal carcinoma among IgA/VCA antibody positive individuals detected by anticomplement immunoenzymatic method.
Clin. Med. J. 97, Nr. 3, 155-157
- ZENG, Y., L.G. ZHANG, Y.C. WU, Y.S. HUANG, N.Q. HUANG, J.Y. LI, Y.B. WANG, M.K. JIANG, Z. FANG u. N.N. MENG (1985):
Prospective studies on nasopharyngeal carcinoma in Epstein-Barr virus IgA/VCA antibody-positive persons in Wuzhou City, China.
Int. J. Cancer 36, Nr. 5, 545-547

- ZHU, X.X., Y. ZENG u. H. WOLF (1986):
Detection of IgG and IgA antibodies to Epstein-Barr virus membrane antigen in sera from patients with nasopharyngeal carcinoma and from normal individuals.
Int. J. Cancer 37, Nr. 5, 689-691
- ZIEGLER, F., H. METZGER u. K.-H. HÜBENER (1984 a):
Behandlungsergebnisse beim Nasopharynxkarzinom nach Telekobalttherapie.
In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.
Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 90-92
- ZIEGLER, J.L., R. MINER, E. ROSENBAUM, E.T. LENNETTE, E. SHILITOE, C. CASAVANT, W.L. DREW, L. MINTZ, J. GERSHOW, J. GREENSPAN, J. BECKSTEAD u. K. YAMAMOT (1982):
Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men.
Lancet, 631-633
- ZIEGLER, K., H.-J. THIEL u. H. RENNER (1984 b):
Therapieergebnisse der Nasopharynxkarzinome.
In: WANNENMACHER, M. (Hrsg.): Nasopharynx-Tumoren.
Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 101-104
- zur HAUSEN, H., W. HENLE, K. HUMMELER, V. DIEHL u. G. HENLE (1967):
Comparative study of cultured Burkitt tumor cells by immunofluorescence, autoradiography and electron microscopy.
J. Virol. 1, 830-837
- zur HAUSEN, H., F.J. O'NEILL, U.L. FREESE u. E. HECKER (1978):
Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumor promotor TPA.
Nature (London) 272, 373-375
- zur HAUSEN, H., H. SCHULTE-HOLTHAUSEN, G. KLEIN, W. HENLE, G. HENLE, P. CLIFFORD u. L. SANTESSON (1970):
EB-virus DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx.
Nature (London) 228, 1056-1058

8 ANHANG

=====

8.1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

A	Ampere
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung(en)
ACIF	anti-complement immunofluorescence (anti-komplementäre Immunfluoreszenz)
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity (Antikörper- vermittelte zelluläre Zytotoxizität)
AG	Antigen
AIDS	acquired immune deficiency syndrome (erworbenes Immunschwäche-Syndrom)
AK	Antikörper
Ala	Alanin
AMPER	Ammoniumperoxidisulfat
Aoc	Amyloxycarbonyl
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate Toluidine Salt
BL	Burkitt-Lymphom
BLZ	Belichtungszeit
Boc	Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaar
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
C	Cytosin
Cys	Cystein
D	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DATD	Diallyltartardiamin
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA (DNS)	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DOC	deoxycholic acid
E. coli	Escherichia coli
EA	early antigen (frühes Antigen)
EA(D)	early antigen (diffuse)
EA(R)	early antigen (restricted)
EBNA	Epstein-Barr Virus-assoziertes nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Enzym-gebundener Immunadsorptionstest)
EM	Elektronenmikroskop
EMA	early membrane antigen (frühes Membran-Antigen)

FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GMT	geometric mean antibody titer (geometrisch mittlerer Antikörper-Titer)
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde (lat. hora)
HBsAg	Hepatitis-B-surface-Antigen
HLA	human leucocyte antigen (humanes Leukozyten-Antigen)
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HSV	Herpes simplex Virus
HIV-I	Humanes Immundefizienz-Virus
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
Ile	Isoleucin
IM	infektiöse Mononukleose
Kan.	Kaninchen
KM	Knochenmark
LDH	Laktat-Dehydrogenase
Leu	Leucin
LMA	late membrane antigen (spätes Membran-Antigen)
LYDMA	lymphocyte-determined membrane antigen (von Lymphozyten determiniertes Membran-Antigen)
Lys	Lysin
M.	Krankheit (lat. morbus)
M	Mol
$\bar{m}$	Mittelwert
MA	Membranantigen
Met	Methionin
MG	Molekulargewicht
min.	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NBT	p-Nitro Blue Tetrazolium Chloride
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NPC	nasopharyngeal carcinoma (Nasopharynx-Karzinom)
NS	Nukleinsäure(n)
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	Pauli-Bunnell-Test
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
PS	Palmitinsäure
RBC	red blood cell (rote Blutzelle)
RES	retikuloendotheliales System
RIA	Radioimmunassay
RM	Rückenmark
RNA (RNS)	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Radiotherapie
s	Standardabweichung
s _m	Standardfehler

SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
Sol.	solution (Lösung)
SPA	Staphylococcus aureus
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline (Tris gepufferte Salzlösung)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TNM-Klassifikation	T: Tumor(-tastbefund), N: regionale Lymphknoten, M: Fernmetastasen
TPA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Tween 20 Tris buffered saline
Tyr	Tyrosin
U	Flußrate (in einer Gelsäule)
ÜLZ	Überlebenszeit
V	Volt
V ₀	Leervolumen (einer Gelsäule)
V _t	Totalvolumen (einer Gelsäule)
Val	Valin
VCA	virus capsid antigen
ZNS	zentrales Nervensystem

8.2 VERZEICHNIS CHEMISCHER FORMELN

CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaF ₂	Kalziumfluorid
CaO	Kalziumoxid
C-H-Verbindung	Carboneum-Hydrogenium-Verbindung (Kohlen-Wasserstoff-Verbindung)
CH ₂ Cl ₂	Methylenchlorid
COOH	Carboxyl-Gruppe
Et ₃ N	Triethanolamin (N(C ₂ H ₄ OH) ₃)
EtOH (C ₂ H ₅ OH)	Ethanol
HCl	Salzsäure
HF	Fluorwasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
KCN	Kaliumzyanid
MeOH (CH ₃ OH)	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₂	Aminogruppe
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Hans WOLF danke ich für die Überlassung des Themas, seine wohlwollende Unterstützung und die gebotenen Möglichkeiten zur Durchführung dieser Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Susanne MODROW danke ich für die vorbildliche Betreuung meiner Dissertation und die Durchführung der Immunpräzipitationen.

Herrn Dr. med. Wolfgang JILG danke ich für die bereitwillige Mithilfe bei den Blutentnahmen an den Kaninchen in der GSF Neuherberg.

Frau Renate KÜHBECK, Frau Evelyn-Maria MEYER und Herrn Manfred MARSCHALL danke ich für die labortechnischen Unterweisungen und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Frau Helga SCHMIDT danke ich im besonderen für die hervorragende Anfertigung sämtlicher Fotografien im Rahmen dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern des Max von Pettenkofer-Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, danke ich für wertvolle Anregungen und eine gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Ronald MERTZ danke ich für die automatisierten Peptidsynthesen am Genzentrum in Martinsried.

Meinem Freund, Herrn Dipl. Ing. Josef ERNST, danke ich herzlich für die Plotter-Graphiken und die zugebilligten Schreib- und Druckmöglichkeiten am Institut für Arbeitsphysiologie.

Meinem sehr geschätzten Hochschullehrer, Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. h.c. mult. Anton MAYR, danke ich für die Übernahme und Vertretung dieser Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät.

Schließlich gilt ein ganz besonderes Dankeschön meinem verdienten Lehtierarzt, Herrn Dr. med. vet. Peter WAPLER, sowie Herrn Dr. med. vet. Heinz GEIST, die mir durch Ihr stets großzügiges Entgegenkommen und das Überlassen von gelegentlichen Praxistätigkeiten die Finanzierung meines gesamten Promotionsstudiums ermöglichten.

L E B E N S L A U F

19. 03. 1957 geboren in Bad Mergentheim als erstes von vier Kindern
des Landwirts Josef KLEINHANS und seiner Ehefrau
Stefanie, geb. SCHNEEWEIS
- 4./1964-7./1968 Besuch der Grundschule in Bad Mergentheim-Markelsheim
- 9./1968-7./1976 Besuch des Riemenschneider-Gymnasiums in Würzburg
- 9./1976-6./1978 Besuch der Kollegstufe des Siebold-Gymnasiums Würzburg
und Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife am
29. 06. 1978
- 11./1978 Beginn des vorklinischen Abschnittes im Studienfach
Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in
München
- 9./1980 Beurlaubung für 1 Jahr aufgrund von 5 Augenoperationen
- 11./1981 Beginn des klinischen Abschnittes im Studienfach Tier-
medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 9./1982 1. Staatsexamen im Studienfach Tiermedizin
- 9./1983 2. Staatsexamen im Studienfach Tiermedizin
10. 01. 1985 3. Staatsexamen im Studienfach Tiermedizin und Appro-
bation als Tierarzt am 8. 02. 1985
- Seit 3./1985 Übernahme von gelegentlichen Praxistätigkeiten
- 7./1985 Beginn der Dissertation am Max von Pettenkofer-Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 6./1987 Abschluß und Einreichung der Dissertation

